

# Nanoformulacije kurkumina s antimikrobnim djelovanjem

---

Osmak, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:909075>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Lucija Osmak**

**Nanoformulacije kurkumina s antimikrobnim  
djelovanjem**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, godina 2021.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Oblikovanje lijekova Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za farmaceutsku tehnologiju pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Željke Vanić.

*Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Željki Vanić na stručnom vodstvu, strpljenju i savjetima prilikom izrade ovog diplomskog rada.*

*Zahvaljujem svojoj obitelji i Domagoju jer su mi bili najveća podrška prilikom studiranja te su mi njihova ljubav i razmijevanje uljepšali ove studentske godine.*

*Posebno želim zahvaliti svojoj sestri Katarini koja mi je prije svega puno pomogla u izradi ovog diplomskog rada, kao i sa svim poteškoćama tehničke naravi na koje sam naišla prilikom studiranja, te mi je uvijek strpljivo pružala bezuvjetnu potporu.*

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. KURKUMIN .....	1
1.2. KLASIČNE FORMULACIJE KURKUMINA .....	2
1.3. NANOFORMULACIJE KURKUMINA .....	5
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	<b>8</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>10</b>
<b>4. RASPRAVA</b> .....	<b>11</b>
4.1. ANTIMIKROBNO DJELOVANJE KURKUMINA.....	11
4.2. ANTIBAKTERIJSKO DJELOVANJE KURKUMINA.....	13
4.2.1. LIPIDNE NANOFORMULACIJE .....	13
4.2.2. POLIMERNE NANOFORMULACIJE .....	16
4.2.3. SURFAKTANTNE NANOFORMULACIJE.....	24
4.3. ANTIVIRUSNO DJELOVANJE KURKUMINA .....	26
4.3.1. LIPIDNE NANOFORMULACIJE .....	28
4.3.2. POLIMERNE NANOFORMULACIJE .....	28
4.3.3. OSTALE NANOFORMULACIJE .....	31
4.4. ANTIFUNGALNO DJELOVANJE KURKUMINA .....	32
4.4.1. LIPIDNE NANOFORMULACIJE .....	32
4.4.2. POLIMERNE NANOFORMULACIJE .....	34
4.5. ANTIPARAZITSKO DJELOVANJE KURKUMINA.....	37
4.5.1. LIPIDNE NANOFORMULACIJE .....	38
4.5.2. POLIMERNE NANOFORMULACIJE .....	40
4.5.3. OSTALE NANOFORMULACIJE .....	41
<b>5. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>43</b>
<b>6. POPIS OZNAKA I KRATICA KORIŠTENIH U DIPLOMSKOM RADU</b> .....	<b>44</b>
<b>7. LITERATURA</b> .....	<b>46</b>
<b>8. SAŽETAK</b> .....	<b>55</b>
<b>9. SUMMARY</b> .....	<b>56</b>
<b>10. PRILOZI</b> .....	<b>57</b>

# 1. UVOD

## 1.1. KURKUMIN

Kurkumin, je polifenol, aktivna tvar kurkume (*Curcuma longa*), višegodišnje biljke koja pripada porodici đumbirovki (*Zingiberaceae*). Biljka sadrži 60–70% ugljikohidrata, 8,6% proteina, 5–10% masti, 2–7% vlakana i 3–5% kurkuminoida (kurkumin, demetoksikurkumin i bis-demetoksikurkumin) koji su prikazani na Slici 1. Najzastupljeniji je kurkumin s udjelom od 70% (Trujillo i sur., 2013). Taj intenzivno obojeni žuto-narančasti kristalični prašak, gotovo netopljiv u vodi, izoliran je iz korijena biljke kultivirane u južnoj i jugoistočnoj tropskoj Aziji u 19. stoljeću. Uporaba kurkumina za liječenje upalnih bolesti opisana je još u Ajurvedi i tradicionalnoj kineskoj medicini prije tisuće godina (Shishodia i sur., 2005). U Europi je u uporabi kao boja za nijansiranje proizvoda u žuto-zlatnu boju. U prošlosti se najviše koristio za bojanje kože i tkanina, dok danas ima ulogu boje za hranu. Europska unija odobrila je kurkumin kao dodatak prehrani. Označen je s E100 te se može pronaći na listi sastojaka brojnih slatkiša, namaza i sireva (Praditya i sur., 2019).

Kurkumin ili diferuloimetan s IUPAC imenom (1E,6E)-1,7-bis-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-1,6-heptadien-3,5-dion pokazuje keto-enolnu tautomeriju s dominantno enolnim oblikom u alkalnom mediju i keto oblikom u kiselom i neutralnom mediju (Anand i sur., 2007). Pleiotropni terapijski učinci ovog spoja su posljedica njegovog kompleksnog kemizma i sposobnosti da utječe na brojne signalne puteve regulirane s transkripcijskim nuklearnim faktorom, protein kinazom B i faktorima rasta, citoprotektivne puteve ovisne o nuklearnom faktoru izvedenom iz eritroida 2 te metastatske i angiogenske puteve. Također, veže metale, posebice željezo i bakar, te može funkcionirati kao kelator željeza (Hatcher i sur., 2008).

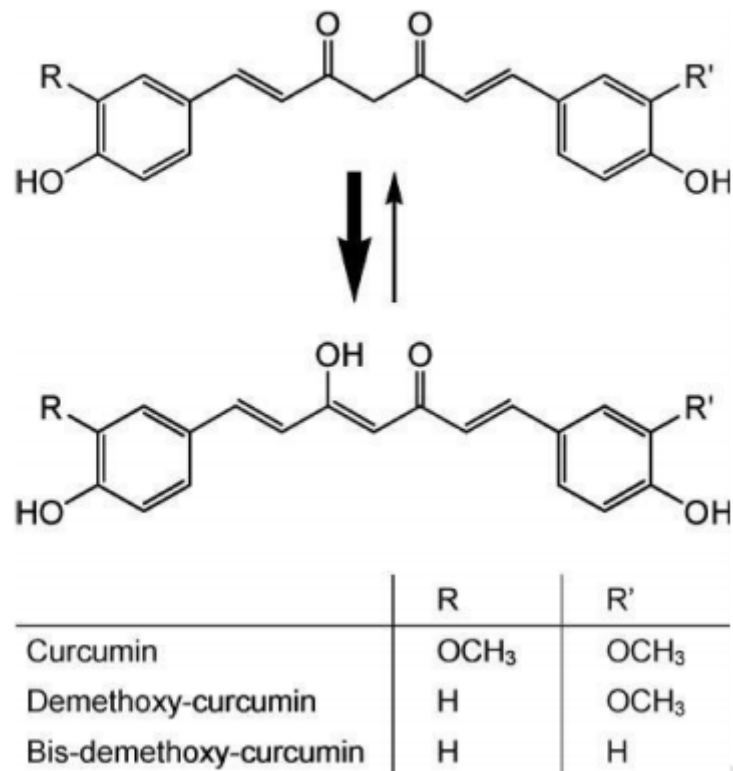
Antioksidativni učinak kurkumina definiran je njegovom sposobnošću da svojim fenolnim skupinama reagira direktno s radikalima poput superoksidnog aniona ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), hidroksilnog radikala ( $\cdot\text{OH}$ ), vodikovim peroksidom, singletom kisika i drugim specijama koje uzrokuju oksidacijski stres u stanicama. Njegov bifunkcionalni antioksidativni učinak uključuje i induciranje ekspresije citoprotektivnih proteina poput superoksid dismutaze, katalaze, glutation reduktaze, peroksidaze i drugih (Trujillo i sur., 2013).

Kurkumin djeluje kao blokator koraka inicijacije kod karcinoma sprječavajući karcinogenu aktivaciju, ali i kao suprimirajući agens inhibirajući proliferaciju malignih stanica tijekom promocije i progresije karcinogeneze. Nekoliko studija na životinjama pokazalo je da

kurkumin ima kemopreventivni učinak ovisan o dozi kod karcinoma kolona, dvanaesnika, želuca i ezofagusa (Hatcher i sur., 2008).

Zbog njegove sposobnosti modulacije važnih molekularnih meta (enzimi, transkripcijski faktori, citokini, receptori) danas se koristi u liječenju velikog broja bolesti poput karcinoma, artritisa, dijabetesa, Crohnove bolesti, kardiovaskularnih bolesti, osteoporoze, Alzheimerove bolesti, psorijaze i brojnih drugih (Shishodia i sur., 2005).

Slika 1. Prikaz molekula kurkumina, demetoksikurkumina i bis-demetoksikurkumina te keto-enolnih tautomera. Preuzeto iz Siviero i sur. (2015), uz dozvolu izdavača (*Elsevier*).



## 1.2. KLASIČNE FORMULACIJE KURKUMINA

Prašak usitnjenog korijena biljke kurkume koristi se više od 2000 godina u azijskoj kuhinji, medicini, kozmetici i bojanju materijala, a uporaba se nastavlja i danas. U Ajurvedi se

koristi topao oblog od paste kurkumina za liječenje očnih infekcija, rana, ugriza, opekline i akni. Za indijsko tržište američka farmaceutska tvrtka Johnson & Johnson proizvodi kurkuminske flastere. Ženama u Indiji se nakon poroda daje tonik od svježe smjese kurkumina s praškom od đumbirovog korijena i meda uz čašu toplog mlijeka (Hatcher i sur., 2008). U tradicionalnoj medicini Istoka, kurkumin se koristi za liječenje anoreksije, kašlja, dijabetičkih rana, reume i upale sinusa. Jedan od popularnih kućnih pripravaka je pasta kurkume u kalcijevom hidroksidu za liječenje upala i rana (Shishodia i sur., 2005). Kurkumin obično dolazi u obliku narančasto-žutog mljevenog praška koji je, osim za izradu toplih napitaka i čajeva, pogodan za začinjavanje brojnih vrsta jela. Na hrvatskom tržištu se osim praška mogu pronaći različite tablete i kapsule s ekstraktom kurkumina (Tablica 1). Djelovanje ekstrakta kurkumina je neusporedivo jače od djelovanja začina kurkume iz razloga što kurkuma začim sadrži najviše 3-5%, dok ekstrakt sadrži čak 95% kurkuminoida. Česti oblik na tržištu su kapsule, npr. Kurkuma 95% ekstrakt & Bioperine® koje sadrže ekstrakt kurkumina s piperinom, ekstraktom crnog papra koji pojačava djelovanje i apsorpciju kurkumina u stanice (<https://ljekarna.hr/dodaci-prehrani/1578-kurkuma-95-ekstrakt-kapsule-60x400mg.html>).

Također, kurkuma je na tržištu prisutna u multivitaminskim formulacijama poput Solgar Omnium® tableta gdje je zastupljena u obliku standardiziranog ekstrakta korijena kurkume s masom od 47,5 mg kurkuminoida (<https://www.mojaljekarna.hr/multivitamini/2505-solgar-omnium.html>). U ljekarnama se može pronaći i Curcumin C3 Complex® koji je standardiziran na najmanje 95% kurkuminoida, a sadrži 3 glavna kemijska spoja: kurkumin, demetoksikurkumin i bis-demetoksikurkumin. Curcumin C3 Complex® jedini je kurkumin na tržištu klinički ispitan i priznat od strane Američke agencije za hranu i lijekove (FDA) kao potpuno siguran proizvod, tzv. *generally recognized as safe* (GRAS). Većina dodataka prehrani sadrži pročišćene ekstrakte kurkume s deklariranim sadržajem kurkumina (400-500 mg po jednoj dozi (kapsula ili tableta)) (<https://ljekarna-kovacicek.hr/kurkuma-i-kurkumin>). Osim kurkumina u obliku tableta i kapsula za terapijsku primjenu, na tržištu je zastupljen i kao dodatak u brojnim kozmetičkim proizvodima, sapunima, energetskim pićima i mastima (Gera i sur., 2017).

Na uspješnost terapije kurkuminom, koji je primijenjen peroralno, značajno utječu njegova fizikalno-kemijska svojstva. Kurkumin je hidrofobna supstancija slabe topljivosti u vodi, pogotovo u neutralnim ili kiselim uvjetima u želucu gdje je potpuno protoniran. U alkalnim uvjetima je kemijski nestabilan i ima nisku bioraspoloživost zbog kemijske transformacije metaboličkim enzimima u gastrointestinalnom sustavu. Uz sve navedeno, kurkumin je podložan razgradnji, pogotovo kad je izložen svjetlu, visokim temperaturama i

alkalnim uvjetima. Stoga je iznimno važno razviti formulacije kojima će se osigurati veća stabilnost i poboljšati postojeća loša farmakokinetička svojstva kurkumina (Zheng i McClements, 2020).

Tablica 1. Prikaz dostupnih preparata s kurkuminoidima na hrvatskom tržištu i njihov sastav

NAZIV PRIPRAVKA	SASTAV	PROIZVOĐAČ
<b>Kurkuma 95% ekstrakt &amp; Bioperine®</b>	Dnevna doza (2 kapsule) sadrži 700 mg suhog ekstrakta korijena kurkume standardiziranog na najmanje 95% kurkuminoida i 10 mg suhog ekstrakta ploda crnog papra BioPerine® standardiziranog na najmanje 95% piperina.	Hug Your Life, Hrvatska
<b>Solgar Omnium®</b>	Vitaminsko-mineralni kompleks koji obiluje biljnim ekstraktima kao što su zeleni čaj, sjemenke grožđa, kurkuma, brokula i soja. Dnevna doza (2 tablete) sadrži standardizirani ekstrakt korijena kurkume [46,5 mg (93%) kurkuminoida].	Solgar, Sjedinjene Američke Države
<b>Curcumin Complex®</b>	<b>C3</b> Kompleks 3 standardizirane vrste kurkuminoida s unaprijedom formulacijom vitamina D3, B6, B12 i mineralom selenom. Dobiva se iz suhih rizoma kurkume i standardizira na minimum 95% kurkuminoida. 1 kapsula sadrži 427 mg kurkuminoida.	Hug Your Life, Hrvatska
<b>BCM-95®</b>	Patentirani kompleks kojem jedna kapsula od 500 mg sadrži 450 mg kurkumina i 50 mg etričnog ulja kurkume. Klinički dokazano da u krv donosi do 7 puta više bioaktivnih kurkumionoida od ostalih standardnih proizvoda kurkume zbog dodatka eteričnog ulja koje povećava apsorpciju ekstraktu kurkume.	Sangreen, Hrvatska
<b>NovaSOL® Curcumin</b>	Jedna kapsula sadrži 30 mg micelarnog kurkumina, što odgovara 5,5 g čistog kurkumina. Kurkumin je uklopljen u micelu i kombiniran s vitaminom D3 (5,4 µg) te se postiže 185x veća bioraspodjelivost.	AQUANOVA AG, Njemačka



### 1.3. NANOFORMULACIJE KURKUMINA

Unatoč dokazanoj sigurnosti i djelotvornosti kurkumina, njegova klinička upotreba je ograničena zbog loše bioraspoloživosti. Razlozi tome su loša topljivost, slaba intestinalna permeabilnost i ekstenzivan metabolizam kurkumina sulfatacijom, glukuronidacijom i redukcijom u crijevima. Istraživani su i razvijeni različiti pristupi kojima bi se nadvladali ovi limitirajući faktori. Prvenstveno su korišteni prirodni pojačivači apsorpcije poput piperina, kvercetina, genisteina, eugenola, resveratrola i drugih koji povećavaju učinkovitost kurkumina uz prihvatljive ekonomske troškove za formuliranje takvih oblika. Osim njih, konjugacija kurkumina i fosfolipida (C-fitosom, C-liposom) ili kurkumina i polimera (C-ciklodekstrin, C-kopolimer mliječne i glikolne kiseline (PLGA) nanočestice) također povećava bioraspoloživost i djelotvornost kurkumina (Siviero i sur., 2015).

Iz brojnih istraživanja proizašao je zaključak da primjenom nanotehnologije u formulacijama s kurkuminom dolazi do njegove bolje distribucije u organizmu i poboljšanog terapijskog učinka. Nanoformulacije poput liposoma, polimernih nanočestica, micela, nanogelova, niosoma, ciklodekstrina, dendrimera, srebrnih nanočestica i čvrstih lipidnih nanočestica pokazale su se vrlo važnima u postizanju terapijskih koncentracija kurkumina. Pomoću njih su prevladana loša svojstva kurkumina koja su onemogućavala njegovu dostatnu apsorpciju i učinkovito djelovanje (Ghalandarlaki i sur., 2014).

Nanotehnologija je skup disciplina koje se bave istraživanjem, razvojem i primjenom struktura, uređaja i sustava kojima su mjere reda veličine atoma, molekula i makromolekula, dakle u području do 100 nm ( $1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$ ), a koji zahvaljujući svojim malim mjerama imaju posebna svojstva (<https://enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=42898>). Robert Langer, profesor na Tehnološkom institutu države Massachusetts (M.I.T.-u), napominje da je nanotehnologija „posebno važna u razvijanju novih sustava za prijenos lijekova po tijelu. Nanočestice koje na sebe vežu lijek zbog svojih malih dimenzija mogu putovati krvotokom, ući u stanicu i u njoj ispustiti svoj sadržaj“ (Bilušić, 2006).

Nanoformulacije imaju značajno veću korist u odnosu na tradicionalne terapijske sustave zbog njihove male veličine i posljedično velike površine. One povećavaju bioraspoloživost kurkumina povećanjem topljivosti i mehanizmom transporta intaktnih nanočestica kroz gastrointestinalnu mukozu. Korištenjem nanoformulacija može se postići poboljšana permeacija kroz mukozna tkiva te ravnomjerno i kontrolirano oslobađanje kurkumina na željenom mjestu djelovanja. Produljeno vrijeme eliminacije i ciljana dostava polifenola, zahvaljujući specifičnoj apsorpciji *in vivo*, velika je prednost ovih formulacija.

Upravo su lijekovi koji pripadaju klasi IV prema Biofarmaceutskoj klasifikaciji lijekova (BCS), poput kurkumina, odlični kandidati za navedene formulacije zbog svoje slabe topljivosti i permeabilnosti (Ipar i sur., 2019).

Smanjenje veličine čestica značajno pospješuje učinkovitost kurkumina u nanoformulacijama u usporedbi s nativnim kurkuminom. Većinom se koriste čestice veličine 10-100 nm za terapijsku primjenu i klinička istraživanja. Zbog manje veličine, a time i veće površine, kurkumin može ući u organe koji su nedostupni običnom kurkuminu. Važan je za terapiju infektivnih bolesti uzrokovanih unutarstaničnim patogenima jer ima veći unutarstanični apsorpcijski kapacitet (Flora i sur. 2013). Nanotehnologijom je omogućena dostava antimikrobnih lijekova unutar stanice i do retikuloendotelnog sustava gdje se nalaze bakterije poput *Mycobacterium tuberculosis* koje tako skrivene dovode do rekurentnih sistemskih infekcija (Škalko-Basnet i Vanić, 2017). Zahvaljujući povećanoj površini čestica, postignutoj postupkom usitnjavanja, dolazi do ubrzane raspadljivosti i topljivosti kurkumina u vodi što osigurava veću bioraspoloživost kurkumina uklopljenog u nanočestice. Velika specifična površina rezultira jačim odgovorom kurkumina prema molekularnoj meti i jača njegovu farmakološku aktivnost (Mohanty i Sahoo, 2010). Pozitivan naboj na površini nanočestica kurkumina omogućuje jaku interakciju s negativno nabijenom površinom stanica čime se povećava brzina apsorpcije kurkumina. Nasuprot tome, negativno nabijene čestice imaju veću stabilnost u cirkulaciji (Yallapu i sur., 2015). Hidrofobni kurkumin slabo formira vodikove veze i hidrofobne interakcije s masnim acilnim lancima membranskih lipida što rezultira niskom koncentracijom u plazmi (Karthikeyan i sur., 2020). Njegovim uklapanjem u nanoformulacije (nanoliposome, nanočestice) postiže se učinkovitija dostava u stanice što dovodi do smanjenja potrebne doze kurkumina i rjeđe učestalosti primjene (Flora i sur., 2013). Ispitivanja antibakterijske aktivnosti vodenih disperzija nanokurkumina pokazala su nižu vrijednost minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) u odnosu na MIK otopine kurkumina u dimetil sulfoksidu (DMSO) (Bhawana i sur., 2011).

Unatoč brojnim prednostima nanoformulacija aktivnih tvari, postoje i određena ograničenja njihove primjene. Prilikom njihovog dizajniranja i pripreve važno je osigurati dostavu uklopljenog lijeka (djelatne tvari) na željeno mjesto djelovanja, smanjiti toksičnost uz zadržavanje terapijskog učinka te postići zadovoljavajuću stabilnost i biokompatibilnost (De Jong i Borm, 2008). Mnoga istraživanja nanoformulacija kurkumina izvedena su samo u pretkliničkoj fazi i zbog toga nema dovoljno informacija o mogućoj toksičnosti nanokurkumina kod primjene na ljudima. Toksičnost se može očitovati kroz oštećenje deoksiribonukleinske kiseline (DNA), alergijske reakcije, neuropale i ekscitotoksičnost. Još jedan nedostatak

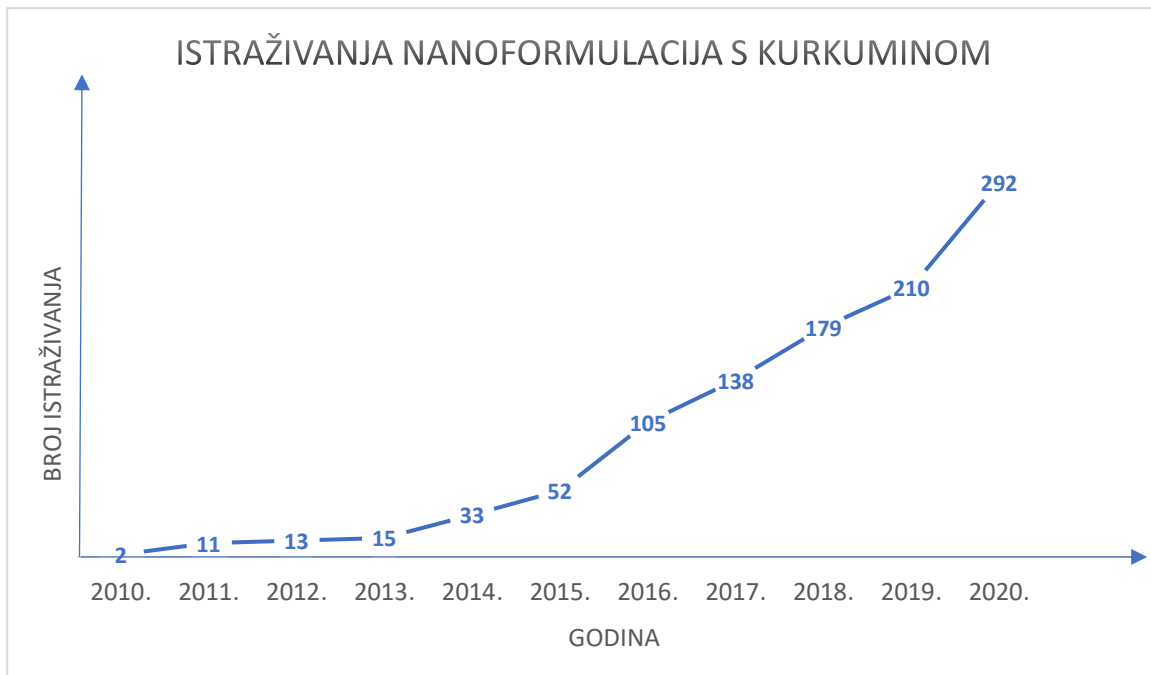
kurkumina uklopljenog u nanočestice je nespecifičnost prema tkivima što rezultira napadanjem i uništavanjem zdravog tkiva oko oštećenih i tumorskih stanica (Karthikeyan i sur., 2020). Bakand i Hayes (2016) su istraživanjem nanočestica kurkumina primjenjenih pulmonalno uočili njihovu opasnost za krvno-moždanu barijeru jer zbog malene veličine prolaze kroz stanične membrane i biološke barijere. Poveću opasnost predstavlja i rizik slabog vezanja kurkumina na nano-nosač zbog čega dolazi do neprikladnog oslobađanja uklopljene tvari ili *in vivo* razgradnje nosača (Maleki Dizaj i sur., 2019). Troškovi pripreme takvih inovativnih formulacija su prilično veliki te je potrebno razviti ekonomski prihvatljivije metode pripreve prikladne za industrijsku proizvodnju. Time bi se omogućila učinkovita terapijska primjena kurkumina čiji bi učinak bio jednakovrijedan (usporediv) klasičnim, sintetičkim lijekovima (Karthikeyan i sur., 2020).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Polifenol kurkumin, izoliran iz korijena biljke kurkume, ima dugu povijest korištenja u tradicionalnoj medicini Kine i Indije. Ima dobar sigurnosni profil i široki spektar terapijskih učinaka uključujući protuupalno, antioksidativno, kemoprotektivno i kemoterapijsko djelovanje (Hatcher i sur., 2008). Koristi se u liječenju brojnih bolesti poput psorijaze, upalnih bolesti crijeva, reumatoidnog artritisa, sistemske skleroze, sistemskog eritematoznog lupusa, multiple skleroze i dijabetesa. Usprkos različitim pozitivnim učincima, kurkumin ima vrlo nisku bioraspoloživost zbog slabe topljivosti u vodi, nestabilnosti pri fiziološkom pH, otežano se unosi u stanice i ima brzi intracelularni metabolizam (Siviero i sur., 2015). Lošoj bioraspoloživosti doprinosi kratko vrijeme polueliminacije koje za oralno primijenjeni kurkumin u dozi 500 mg/kg tjelesne mase kod štakora iznosi svega 44 minute, što upućuje da je oralna bioraspoloživost kurkumina kod ljudi otprilike 1% (Perkins i sur., 2002).

Zbog sve veće rezistencije mikroorganizama na postojeće klasične antimikrobne lijekove, velike nade se polažu u razvoj formulacija lijekova biljnog podrijetla s izraženim antimikrobnim učinkom, poput kurkumina, o čemu svjedoči izrazito veliki broj provedenih istraživanja zadnjih desetak godina (Slika 2). Štoviše, uklapanjem kurkumina u nanososače moguće je povećati njegovu topljivost, postići bolji unos u stanice (internalizaciju), osigurati veću stabilnost, smanjiti dozu potrebnu za ostvarivanje zadovoljavajućeg terapijskog učinka te u konačnosti, manju učestalost doziranja (Škalko-Basnet i Vanić, 2017).

Pregledom znanstvene literature utvrđeno je da nanoformulacije poput liposoma, micela, nanogelova, niosoma, polimernih čestica i ciklodekstrina mogu nadvladati loša fizikalno-kemijska svojstva kurkumina te poboljšati njegovu apsorpciju i terapijski učinak. Uzimajući u obzir sve te činjenice i imajući u vidu brojna terapijska područja primjene kurkumina, svrha ovog rada je bila dati sistematizirani osvrt na potencijale, ali i nedostatke nanoformulacija kurkumina s antimikrobnim djelovanjem. Sistematizacija rezultata istraživanja provedena je s obzirom na vrstu/tip nanoformulacija i svojstva materijala korištenih za njihovu pripravu.



Slika 2. Prikaz rastućeg trenda istraživanja nanoformulacija kurkumina tijekom zadnjeg desetljeća. Grafikon je izrađen korištenjem podataka dobivenih pretraživanjem *ScienceDirect* baze podataka korištenjem pojma „*curcumin nanoformulations*“ tijekom zadnjih 10 godina (pristupljeno 14.05.2021.).

### 3. MATERIJALI I METODE

Prilikom pisanja ovog diplomskog rada pretraživane su *on-line* znanstvene baze podataka (*PubMed, Scopus, ScienceDirect*) te je pregledana dostupna znanstvena literatura, udžbenici u tiskanom i elektroničkom obliku te članci u stručnim časopisima. Pritom su korištene ključne riječi na engleskom jeziku: *nanoformulations, curcumin, bioavailability, liposomes, micelles, cyclodextrin, niosomes, nanocurcumin, oral bioavailability, solubility, antimicrobial activity, antibacterial activity, antiviral activity, antifungal activity, antiparasitic activity*.

Znanstvena literatura je pretraživana prema temi istraživanja, predmetu istraživanja i autorima te je proučavana analitički i kritički radi definiranja znanstvenog i stručnog problema. Pri pretraživanju literature traženi su odgovori na specifična pitanja usko vezana za temu ovog diplomskog rada, a na temelju pronađenih podataka izvedena su vlastita promišljanja o razmatranoj problematici. U ovome radu izdvojeni su najznačajniji rezultati istraživanja, rasprave i zaključci.

## 4. RASPRAVA

Kurkumin je prirodno terapijsko sredstvo sa širokim terapijskim potencijalom uključujući protuupalno, antimikrobno, antioksidativno i kemoprotektivno djelovanje. U ovom diplomskom radu obrađene su nanoformulacije kurkumina s antimikrobnim učincima.

### 4.1. ANTIMIKROBNO DJELOVANJE KURKUMINA

Kurkumin ulazi u interakciju sa specifičnim FTsZ proteinom koji ima ključnu ulogu u dijeljenju stanica mikroorganizama. Atomi kisika iz fenolne, metoksi i dvije karbonilne skupine vezane na fenolne prstenove kurkumina stvaraju vodikove i hidrofobne veze s katalitičkim mjestom tog proteina ometajući tako aktivnost njegova gvanozin trifosfata i dovodeći do smrti stanice (Kaur i sur., 2010). Antimikrobno djelovanje kurkumina uočeno je kod brojnih vrsta bakterija uključujući *Helicobacter pylori*, *Salmonella paratyphi*, *Azotobacter* te vrsta *Streptococcus*, *Staphylococcus* i *Lactobacillus*. Matriksne metaloproteinaze 3 i 9 upalne su molekule u *H. pylori* čiju ekspresiju regulira kurkumin i pokazuje učinkovito antibakterijsko djelovanje. Dokazan antivirusni učinak prisutan je kod virusa hepatitisa C (HCV) i *herpes simpleks virusa tip 1* (HSV-1). Antifungalno djelovanje prisutno je na vrste *Candida albicans* i *Aspergillus*. Kurkumin pokazuje i antiparazitsko djelovanje na protozoe *Plasmodium falciparum* i *Leishmania major* (Rai i sur., 2015). Mikroemulzija miristinske kiseline s kurkuminom koristi se za inhibiciju *Staphylococcus epidermidis* koja je glavni uzročnik nozokomijalnih infekcija (Liu i Huang, 2012). Osim toga, dokazano je da vodena disperzija kurkumina izrađena metodom vlažnog mljevenja ima antibakterijski učinak na vrste *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa* te antifungalni učinak na *Penicillium notatum* i *Aspergillus niger*. Redukcija veličine čestica kurkumina rezultirala je značajnim poboljšanjem topljivosti i antimikrobne aktivnosti spoja. Nanočestice kurkumina imaju puno bolju antibakterijsku aktivnost od antifungalne te jače djeluju na Gram-pozitivne nego na Gram-negativne bakterije. Transmisijskom elektronskom mikroskopijom pokazano je da čestice nanokurkumina uzrokuju staničnu smrt ulaskom u bakterijsku stanicu (Bhawana i sur., 2011).

Usporedbom baktericidne aktivnosti makro-, mikro- i nano-kurkumina pomoću spektrofotometrije i difuzijske metode dokazana je najveća aktivnost nanokurkumina. Iako sva 3 oblika kurkumina pokazuju antibakterijsku aktivnost, uključujući i makrokurkumin koji je komercijalno dostupan, smatra se da nanokurkumin zbog manje veličine čestica ima bolju

permeabilnost i topljivost, a time i jače reducira rast bakterija (Gopal i sur., 2015). Prilikom evaluacije antimikrobne aktivnosti mikro- i nano-kurkumina važno je uzeti u obzir da na njihov antimikrobni učinak utječu i drugi čimbenici osim veličine čestica. Parametri poput korištenog otapala i testova antimikrobne osjetljivosti česte su varijable u različitim istraživanjima. Korištenjem polarnih otapala poput DMSO-a, etanola i acetona postižu se niže MIK vrijednosti u usporedbi s istraživanjima gdje otapalo uopće nije korišteno (Silva i sur., 2018).

Xie i suradnici (2015) pripravili su nanočestice kurkumina pomoću superkritičnog ugljikovog dioksida za koje je utvrđena veća topljivost te snažnija antibakterijska, antioksidativna i kemoprotektivna učinkovitost. Rezultati su također pokazali i bolji antimikrobni učinak uz smanjenje MIK-a za 50% u odnosu otopinu kurkumina. Još jedan primjer kako pripremom kurkumina u obliku nanočestica veličine 25-148 nm dolazi do značajnog poboljšanja antimikrobne aktivnosti, pokazali su Bader i suradnici (2016). Korištenjem metanolnog ekstrakta nanočestica kurkumina promjeri zona inhibicije za različite bakterije i gljivice iznosili su 18, 20, 23, 17 i 18 mm, dok su za metanolni ekstrakt sirovog kurkumina utvrđene veće vrijednosti (29, 26, 31, 21 i 22 mm). Primjenom ultrazvuka Pandit i suradnici (2015) pripravili su nanočestice kurkumina te ih uklopili u emulzijsku podlogu (antibakterijsku kremu). Na temelju provedenih ispitivanja autori su pretpostavili da je antimikrobna aktivnost nanokurkumina posljedica interakcija fenolne skupine s vanjskim lipopolisaharidnim slojem prisutnim kod Gram-negativnih bakterija. Manje peptidoglikana olakšava oštećenje bakterijske stanice i rezultira smrću stanice. Uljna faza kreme olakšava interakciju nanokurkumina s peptidoglikanskim slojem Gram-negativnih bakterija i omogućuje prekid stanične stijenke. Osim uklapanja kurkumina u emulzijsku podlogu, Huang i suradnici (2015) formulirali su srebrne nanočestice kurkumina veličine manje od 20 nm. Navedenom formulacijom postignuta je veća antimikrobna aktivnost zahvaljujući prodiranju kurkumina kroz membrane mikroorganizama i inhibiciji adenozin trifosfata (ATP-a) i replikacije DNA. Upravo zbog njihove netoksičnosti, ekonomičnosti i benignih bioloških karakteristika nanoformulacije kurkumina postaju sve važniji predmet istraživanja brojnih znanstvenika.

Osim za terapijsku primjenu kod ljudi, kurkumin je ekološki prihvatljiva alternativa u borbi protiv patogenih bakterija u marikulturnom sektoru. Umjesto korištenja velikih količina antibiotika koji se značajno nakupljaju u ribljem mesu, istražen je učinak ekstrakta kurkumina *in vitro* i *in vivo* na riblje patogene te je najveća aktivnost uočena na bakteriju *Proteus mirabilis* (Devi i sur., 2016). Također, nanočestice kurkumina i srebra sintetizirane redukcijom srebrova nitrata u lužnatom mediju koriste se kao učinkoviti antimikrobni agens za konzerviranje hrane



i mesa zahvaljujući njihovoj maloj veličini i velikom antimikrobnom potencijalu (Khan i sur., 2019).

## **4.2. ANTIBAKTERIJSKO DJELOVANJE KURKUMINA**

Utvrđeni su različiti mehanizmi antimikrobnog djelovanja kurkumina u interakciji s bakterijama, poput distribucije stanične membrane, inhibicije replikacije DNA, slabljenja motiliteta i promjene genske ekspresije bakterija (Teow i sur., 2016). Amfipatska priroda omogućuje kurkuminu ulazak kroz staničnu membranu bakterija koja postaje propusna za antibiotike. Svojstvo kurkumina da oštećuje membrane potvrđuje široki spektar njegove antibakterijske učinkovitosti (Tyagi i sur., 2015). Za razliku od stanica sisavaca, u bakterijama inducira nastajanje reaktivnih kisikovih radikala (ROS), uključujući superoksidni anion ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), hidroksilni radikal ( $\cdot\text{OH}$ ) i vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), koji ubijaju bakterije oštećenjem proteina, lipida i DNA (Dai i sur., 2020). Kurkumin inhibira ekspresiju inicijacijskih gena biofilma i gena za *quorum sensing* te smanjuje proizvodnju faktora virulencije, odnosno produkciju acil homoserin laktona, biosintezu piocijanina i aktivnost elastaze/proteaze (Zorofchian i sur., 2014).

### **4.2.1. LIPIDNE NANOFORMULACIJE**

#### **4.2.1.1. LIPOSOMI**

Lipidne formulacije česti su izbor za uklapanje kurkumina s ciljem poboljšanja njegove antibakterijske aktivnosti. Formuliranjem polietilenglikol (PEG)-iliranih liposoma s kurkuminom postignuta je bolja antimikrobna aktivnost u odnosu na nativni kurkumin zahvaljujući boljem uklapanju, bioraspoloživosti i *in vitro* oslobađanju kurkumina. PEG-ilacija je olakšala penetraciju liposoma kroz gastrointestinalnu sluznicu te topljivost kurkumina u vodi koja je u PEG-iliranim liposomima iznosila 20,4 mg/mL i bila 1000 puta veća od topljivosti nativnog kurkumina (20  $\mu\text{g/mL}$ ). Osim povećanja topljivosti, uklapanje kurkumina u liposome rezultiralo je povećanjem njegove stabilnosti jer je nakon 12 sati u vodenom mediju razgrađeno svega 18% kurkumina, za razliku od nativnog kurkumina koji se pokazao nestabilnim (razgrađeno više od 90% nakon 12 sati). Ispitivanjem antimikrobne aktivnosti PEG-iliranih

liposoma, konvencionalnih liposoma i neuklopljenog kurkumina na *B. subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Chromobacterium violaceum*, *E. coli DH10B* i *Mycobacterium smegmatis* metodom difuzije uočene su veće zone inhibicije kod PEG-iliranih liposoma u usporedbi s ostalim formulacijama. Uklapanjem kurkumina u liposome postignuto je bolje antibakterijsko djelovanje jer su poboljšana njegova loša fizikalno-kemijska svojstva poput lipofilnosti, slabe topljivosti u vodi, sporog oslobađanja i loše bioraspoloživosti (Mittal i sur., 2019). U drugoj studiji metodom eksperimentalnog dizajna oblikovana je liposomska formulacija kurkumina veličine liposoma ~100 nm, površinskog naboja ~14 mV i koncentracije 0,05%. Liposomska formulacija bila je stabilna tijekom 60 dana te je tijekom daljnjih ispitivanja uklopljena u gel karbopola. Vrijeme potrebno za postizanje maksimalne koncentracije ( $T_{max}$ ) liposomskog kurkumina uklopljenog u gel postignuto je sat vremena nakon primjene u *stratum corneum* i koži što ukazuje na brzu penetraciju liposoma. U *stratum corneum* maksimalna koncentracija ( $C_{max}$ ) iznosila je 688,3 ng/mL i opseg apsorpcije ( $AUC_{0-t}$ ) ~5857 h×ng/mL, dok je u koži  $C_{max}$  bila ~3 puta manja s vrijednosti 203,3 ng/gm i vrijednosti  $AUC_{0-t}$  ~2938 h×ng/gm. Osim kurkumina, u formulaciju liposomskog gela uklopljeni su i laurinska kiselina (koncentracije 0,05%) i azitromicin (koncentracije 0,005%) nakon čega je difuzijskim testom utvrđeno da gel laurinske kiseline pokazuje ~1,5 puta bolju antibakterijsku aktivnost od nanokurkumina na *Propionibacterium acnes*. Primjenom liposomskih gelova laurinske kiseline i kurkumina istovremeno (1:1) uočen je značajno bolji antibakterijski učinak na sojeve osjetljive na makrolide (1,81x naspram 1,25x) i rezistentne sojeve *P. acnes* (2,93x naspram 1,22x) u odnosu na zasebnu primjenu. *In vivo* studije na štakorima pokazale su 2x veće smanjenje broja komedona i citokina faktora nekroze tumora-alfa (TNF- $\alpha$ ) te interleukina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) kombinacijom gelova s liposomski uklopljenim kurkuminom i laurinskom kiselinom u usporedbi s placebo grupom (Madan i sur., 2018). Kianvash i suradnici (2017) pripremili su propilenglikol liposome s kurkuminom kako bi se ispitaio njihov učinak u liječenju opekline na animalnom modelu. Modifikacijom liposoma s propilenglikolom postignuta je veća permeacija i duže zadržavanje u slojevima kože te nekoliko puta veća koncentracija kurkumina u usporedbi sa slobodnim oblikom kurkumina. Propilenglikol povećava elastičnost fosfolipidnog dvosloja liposoma i tako olakšava penetraciju liposoma i kurkumina u kožu. Nakon 24 sata oslobođeno je 60% kurkumina iz liposoma, dok je za to isto vrijeme oslobođeno 96% kurkumina iz disperzije slobodnog kurkumina. Istraživanje je pokazalo da propilenglikol liposomi kurkumina imaju najveći i najduži protuupalni učinak određen na animalnom modelu edema šape štakora u usporedbi s konvencionalnim liposomima i etosomima (Zhao i sur., 2013). Propilenglikol liposomi s uklopljenim kurkuminom koncentracije 0,3% uzrokovali su 98,8%-tno smanjenje

kolonizacije Gram-pozitivnih bakterija *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus* i *B. subtilis* te Gram-negativne *P. aeruginosa* pronađenih na rani štakora. Značajno lošiji učinak pokazali su prazni liposomi sa smanjenjem od 13,4% i kurkumin otopljen u etanolu s 89,3%. Antibakterijski učinak kurkumina uklopljenog u propilenglikol liposome bio je istovjetan učinku Dermazin<sup>®</sup> kreme (1% srebrni sulfadiazin) koja se koristi u liječenju opekline.

#### 4.2.1.2. ČVRSTE LIPIDNE NANOČESTICE (SLN)

Korištenje lipidnih sustava za uklapanje lipofilnih i teško topljivih supstancija poput kurkumina rezultira povećanjem topljivosti i bioraspoloživosti. Metodom homogenizacije pod visokim tlakom pripravljene su čvrste lipidne nanočestice (SLN) kurkumina srednjeg promjera 112 nm prije i 163 nm poslije provedene liofilizacije. Kolesterol je korišten kao osnova SLN-a zbog dobre fiziološke podnošljivosti i bioraspoloživosti te je diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom uočeno stvaranje vodikovih veza između kurkumina i kolesterola. Uklapanjem u SLN, postignuto je produljeno oslobađanje kurkumina te je nakon 48 sati oslobođeno više od 92% polifenola što je značajno bolje od nativnog pripravka kurkumina gdje je, u manje od sat vremena, oslobođeno više od 95% kurkumina. Osim toga, kolesterol zbog svoje lipidne građe pokazuje veću permeabilnost u bakterije i povećava antibakterijski učinak kurkumina. Usporedbom nativnog i uklopljenog kurkumina u SLN te SLN-a bez kurkumina (kontrola) na sojevima patogene Gram-negativne *E. coli* i Gram-pozitivne *S. aureus* uočena je bolja antibakterijska aktivnost SLN-a kurkumina u odnosu na slobodni kurkumin pri istim koncentracijama. Ova nanoformulacija omogućila je veće uklapanje kurkumina (71%), manju veličinu čestica, produženo oslobađanje i posljedično jači antimikrobni učinak kurkumina. Primjenom SLN-a kurkumina s drugim antibioticima moguće je postići smanjenje MIK-a i minimalne baktericidne koncentracije (MBK) zahvaljujući sinergističkom učinku kurkumina i antimikrobnih lijekova (Jourghanian i sur., 2016). Primjerice, Alihosseini i suradnici (2016) ispitali su sinergistički učinak SLN-a sa zajednički uklopljenim kurkuminom i ampicilinom na *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli*, *Corynebacterium diphtheriae*, *B. subtilis* i meticilin rezistentan *S. aureus* (MRSA). Na temelju dobivenih rezultata zaključeno je da se korištenjem SLN-a s kombinacijom kurkumina i ampicilina postižu značajno manje vrijednosti MIK-a i MBK-a nego otopinama spomenutih djelatnih tvari. Primjerice, MBK za *C. diphtheria* se smanjila 4 puta, a MIK za MRSA-u 2 puta korištenjem SLN formulacije kurkumina i ampicilina

u odnosu na otopine djelatnih tvari. Istraživanja su također pokazala da je za učinak na *S. aureus*, MRSA-u i *P. aeruginosa* bolje formulirati SLN tako da se kurkumin i ampicilin odmah zajedno uklope u formulaciju umjesto da ih se zasebno priprema i zatim pomiješa u omjeru 50 : 50%. U svojem istraživanju Ghaffari i suradnici (2018) pripremili su SLN kurkumina i ampicilina homogenizacijom pri visokom tlaku te pomoću njih formulirali dva polučvrsta pripravka; mast i gel. Nanočestice su pripremljene otapanjem/dispergiranjem aktivnih tvari u vodi i polisorbatu 80, dok su uljnu fazu činili kolesterol i etanol (u omjeru 3:1). Dodatkom vruće uljne faze u vodenu provedena je homogenizacija nakon čega su pripremljene SLN liofilizirane uz 5%-tni manitol kao krioprotektant (Varshosaz i sur., 2010). Gel je formuliran dodatkom gelirajuće tvari (karbopol) u destiliranu vodu i disperziju SNL-a s kurkuminom i ampicilinom, a mast dodatkom vazelina, eucerina i glicerola te SNL-a kurkumina i ampicilina. Antimikrobni učinak tako formuliranih oblika ispitan je na *P. aeruginosa*, *S. aureus* i *E. coli*. Oba pripravka, mast i gel, zadržala su antibakterijski učinak i ubrzala zarastanje rana u usporedbi s placebom i kontrolnom skupinom životinja bez naznaka akutne toksičnosti.

## **4.2.2. POLIMERNE NANOFORMULACIJE**

### **4.2.2.1. NANOKOMPOZITI**

Osim u lipidne nanoformulacije, često je istraživani postupak uklapanja kurkumina u polimerne formulacije poput nanokompozita. Metodom ultrasonikacije razvijene su cink-oksidi/kurkumin nanočestice. Nanočestice cinkova oksida, koje su činile jezgru cink-oksidi/kurkumin nanočestica, pripremljene su precipitacijom i obložene slojem nanokurkumina koji je pripravljen metodom ultrasonikacije pri čemu je nakon suspendiranja kurkumina u diklorometanu provedeno centrifugiranje i sušenje smrzavanjem (liofilizacija). Povećanjem sadržaja cinkova oksida u jezgri povećana je zona inhibicije jer cink-oksidi stvaraju ROS i oslobađaju cinkove katione što dovodi do gubitka održivosti bakterije i stanične smrti. Suprotno tome, povećanjem koncentracije kurkumina u ljuski nanočestica smanjila se zona inhibicije jer kurkumin reducira antimikrobnu aktivnost metala reverzibilnim reakcijama prijenosa elektrona sa superoksidnim ionima. Ovo istraživanje pokazalo je da nanočestice cinkova oksida i kurkumina te nanočestice samog kurkumina imaju bolju antibakterijsku aktivnost prema *S. aureus*, *Shigella dysenteriae*, *E. coli* i *Streptococcus pneumoniae* od komercijalnog antibiotika amoksicilina te potvrdilo sposobnost kurkumina da modificira antibakterijski učinak cinkova

oksida (Varaprasad i sur., 2019). Song i suradnici (2019) formulirali su srebro/kurkumin kompozitne nanočestice metodom ultrazvuka te proučavali sinergističku antibakterijsku aktivnost srebra i kurkumina. Antimikrobni učinak nanokompozita ispitan je na *E. coli* i *B. subtilis* pri čemu je dokazana značajno bolja baktericidna aktivnost s nižim vrijednostima MBK-a. Bakterije su bile izložene polivinilpirolidon-srebrnim, kurkuminskim i srebrnim nanočesticama modificiranim kurkuminom te je nakon izlaganja kompozitu (12,5 µg/mL-200 µg/mL) eliminirano više od 95% bakterijskih stanica. Vrijednosti MIK-a polivinilpirolidon-srebrnih i kurkuminskih nanočestica snižene su sa 32 i 64 µg/mL pri zasebnom korištenju na 8 i 16 µg/mL u kompozitnim nanočesticama. Sinergističkim djelovanjem kurkumin pojačava vezanje srebra na bakterijsku membranu i oslobađanje srebrnih iona ( $\text{Ag}^+$ ) čime se stvara visoka lokalna koncentracija  $\text{Ag}^+$  i povećava stvaranje ROS-a. Posljedično dolazi do oštećenja membrane, istjecanja unutarstaničnog sadržaja te naposljetku stanične smrti i inhibicije rasta bakterija. U prisutnosti antioksidansa, 0,1 mM N-acetilcisteina, smrtnost bakterija smanjila se za 43% iz čega proizlazi da je stvaranje ROS-a temelj sinergističkog djelovanja srebra i kurkumina u ovoj formulaciji.

Još jednu inovativnu formulaciju pripremili su Khamrai i suradnici (2017) umrežavanjem pozitivno nabijenog kitozana s negativno nabijenom bakterijskom celulozom pri čemu je oblikovan polielektrolitni kompozitni film koji omogućuje samoliječenje prilagodbom ionskih interakcija. Površina bakterijske celuloze izolirane i pročišćene od vrste *Glucanoacetobacter xylinus* modificirana je anionskom poliakrilnom kiselinom. Kurkumin je uklopljen u kompozitni film metodom bubrenja tako da su filmovi uronjeni u otopinu kurkumina u DMSO-u na sobnoj temperaturi i nakon toga sušeni uz vakuum na 40 °C. U daljnjim ispitivanjima, uspoređivan je antimikrobni učinak čistog kitozanskog filma, kompozitnog filma i kompozitnog filma s uklopljenim kurkuminom na *S. aureus* i *E. coli* difuzijskom metodom. Rezultati su pokazali da kitozanski i kompozitni film nemaju značajan antibakterijski učinak, dok je kurkuminski kompozitni film maksimalno inhibirao Gram-pozitivnu bakteriju sa zonom inhibicije 15 mm u usporedbi s Gram-negativnom bakterijom (12 mm). Ovom formulacijom postignuto je produženo oslobađanje kurkumina zbog vodikovih veza između hidrofobnog kurkumina i površinski modificirane bakterijske celuloze te umrežene strukture nastale ionskim interakcijama kitozanskog matriksa i bakterijske celuloze. U drugoj studiji, nanočestice hidroksiapatita (HAP) sintetizirane su metodom posredovanom surfaktantom, a za sintezu nanokompozita HAP/kurkumin različite količine kurkumina umiješane su u otopinu kalcijeva nitrata tetrahidrata i acetona s daljnjim postupkom istim kao za sintezu nanočestica HAP-a. Kontrolni (bez kurkumina i HAP-a), nativnom kurkuminu,

nanočesticama HAP-a i kurkumin/HAP nanokompozitima ispitana je antimikrobna aktivnost na *B. cereus*, *Ochrobacterium anthropi* i *Pseudomonas fluorescens*. Sve sintetizirane formulacije pokazale su inhibicijsku aktivnost na rast navedenih bakterija. Značajna inhibicija rasta bakterije *O. anthropi* zapažena je kod čistog kurkumina i kurkumin/HAP nanokompozita, a sve većim porastom koncentracije kurkumina u kompozitu postignuta je snažnija inhibicija kolonizacije bakterije. Rezultati provedenih ispitivanja su pokazali da kurkumin/HAP nanokompozit nema hemolitički učinak što ga čini sigurnim za korištenje u antimikrobnoj terapiji kod ljudi (Jogiya i sur., 2017).

#### 4.2.2.2. POLIMERNE NANOČESTICE

Brojni znanstvenici formulirali su različite polimerne nanočestice kurkumina i ispitivali njihov učinak na različite vrste bakterija (Tablica 2). Uklapanjem kurkumina, prirodnog fotosenzibilizatora, u PLGA nanočestice i njihovim uklapanjem u manitolni matriks postupkom sušenja raspršivanjem, proizveden je suhi prašak za inhalaciju namijenjen tretiranju respiratornih infekcija. Kurkuminske nanočestice u manitolu pripravljene su nanoprecipitacijom; metodom koja je često korištena u proizvodnji nanočestica uskog raspona veličina i velike uspješnosti uklapanja lipofilnih tvari. Nakon obasjavanja snopom svjetlosti nanočestice kurkumina reducirale su održivost *E. coli* za 95,44%, a nanočestice kurkumina dispergirane u manitolu za 97,75% i *Staphylococcus saprophyticus subsp. bovis* za 99,9%. Ove formulacije su, zbog dobrog redispersiranja i vezanja na bakterijsku staničnu stijenku, male toksičnosti, visoke fotoinaktivacije, minimalnih nuspojava i visoke antibakterijske učinkovitosti, idealne za lokalnu terapiju bakterijskih infekcija. Nanočestice kurkumina proizvedene postupkom sušenja raspršivanjem pokazale su dobra aerodinamička svojstva (optimalna veličina čestica i nizak negativan površinski naboj) za dostatno odlaganje u nižim dijelovima respiratornog trakta (Preis i sur., 2019). Trigo i suradnici (2017) uklopili su kurkumin maksimalne koncentracije 260  $\mu\text{M}$  u polimerne nanočestice koristeći polimljiječnu kiselinu (PLA). PLA je poželjni polimer za nanoformulacije u antimikrobnoj terapiji zbog svoje biokompatibilnosti, biorazgradivosti i netoksičnosti nastalih produkata razgradnje (monomeri mliječne kiseline). Učinak nanočestica kurkumina uspoređivan je s otopinom kurkumina u antimikrobnoj fotodinamičkoj terapiji na planktonske kulture i biofilmove *Streptococcus mutans* i MRSA-e, a citotoksičnost je proučavana na keratinocitima. Anionske nanočestice pokazale su reduciranu fotoinaktivaciju biofilмова, a kationske mikrobicidni učinak u

odsutnosti svjetla. Navedene formulacije povećale su topljivost kurkumina u vodi, a kurkuminu uklopljenom u anionske nanočestice reducirana je citotoksičnost u usporedbi sa slobodnim kurkuminom u 10%-tnom DMSO-u i kationskim nanočesticama kurkumina. U još jednoj studiji provedena je inkapsulacija kurkumina u PLA nanočestice potpomognuta ekstraktom pektina metodom emulgiranja uz otparavanje otapala što je rezultiralo maksimalnom uspješnosti uklapanja od približno 90%. *In vitro* istraživanja pokazala su naglo oslobađanje kurkumina kroz prvih 12 sati nakon čega je uslijedilo produženo oslobađanje uklopljene tvari. Antimikrobni učinak nanokapsula na Gram-negativnu *E. coli* i Gram-pozitivnu *S. aureus* ispitan je metodom brojanja kolonija te su utvrđene MIK vrijednosti od 937 mg mL<sup>-1</sup> za *E. coli* i 0,468 mg mL<sup>-1</sup> za *S. aureus*. Nakon 48 sati oslobođeno je 65% kurkumina iz PLA/kurkumin nanočestica. Zbog produženog oslobađanja kurkumina, nanoformulacija pripremljena ovom metodom velike je terapijske učinkovitosti zahvaljujući visokom kapacitetu uklapanja i produženom djelovanju kurkumina (Alippilakkotte i Sreejith, 2018). Korištenjem inovativne sol-gel polimerizacijske tehnike Krausz i suradnici (2015) formulirali su nanočestice silana sa strukturiranom poroznom mrežom u koju je uklopljen kurkumin. Sol-gel metodom postignuta je prednost nad drugim nanoformulacijama poput većeg kapaciteta uklapanja kurkumina nego u liposome i jednostavnog modificiranja formulacijskih karakteristika (promjena veličina pora utječe na brzinu oslobađanja tvari). Osim toga, metoda je biokompatibilna, netoksična i ekonomski isplativa. Uklapanjem PEG 400 i kitozana u poroznu mrežu formiraju se vodikove veze koje inhibiraju naglo te omogućuju produženo oslobađanje uklopljene tvari, tj. kurkumina. *In vivo* učinkovitost zacjeljivanja rana i antimikrobna aktivnost nanočestica kurkumina bila je značajno veća od otopine kurkumina. Uzrok tomu je redukcija veličine čestica, olakšani prolaz kroz biološke barijere i porast interakcija sa stanicama domaćina i mikrobnim patogenima. Nanočestice kurkumina ulaze u interakciju s membranom MRSA-e što rezultira edemom i lizom stanice. Brojanjem jedinica koje tvore kolonije (CFU) utvrđeno je da nanočestice kurkumina pokazuju 97%-tnu i 60%-tnu redukciju rasta MRSA-e i *P. aeruginosa* što je značajno više od kontrole bez kurkumina u istraživanju. Kako bi poboljšali antioksidativni i antimikrobni učinak kurkumina Gomez-Estaca i suradnici (2017) uklopili su kurkumin u želatinske mikročestice pomoću elektrohidrodinamičke atomizacije. Prednost ove metode je dobivanje čestica uskog raspona veličine, visoka moć uklapanja i izbjegavanje razdvajanja čestica od otapala kao što je slučaj s brojnim drugim tehnikama. Sferične želatinske čestice veličine od nekoliko nanometara do 1 milimetara sadržavale su 10%-tni kurkumin s efikasnosti uklapanja blizu 100%. Nasuprot nativnom kurkuminu čiji je antibakterijski učinak bio neznačajan pri koncentracijama do 100 mg/mL, kurkumin uklopljen u želatinu već je pri 4

mg/mL reducirao populaciju bakterija *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *S. aureus* i *E. coli*. Velika topljivost želatine u vodi i kapacitet stvaranja kompleksa s polifenolima čine ju izvrsnim nosačem kurkumina. Naime, korištenjem želatine kurkuminu je približno 40 puta povećana topljivost s ~2,0 mg/L komercijalnog kurkumina na ~77 mg/L nanokurkumina. U drugom istraživanju, kombinacijom srebrnih nanočestica i nanočestica kurkumina potvrđen je aditivni učinak u eradikaciji zrelih biofilmova i inhibiciji nastajanja biofilmova *P. aeruginosa* i *S. aureus*. Potpuna inhibicija nastanka biofilmova utvrđena je kod nanočestica koje sadrže 30 µg/mL kurkumina i 3,75 µg/mL srebra, dok je korištenje nanočestica kurkumina (20 µg/mL) rezultiralo inhibicijom svega 40% biofilma čime je pokazano da kombinacija kurkuminskih i srebrnih nanočestica ima jači antibakterijski učinak. Uklapanjem kurkumina u nanoformulacije povećava se antibakterijska aktivnost što dokazuje činjenica da kurkuminske nanočestice učinkovito inhibiraju nastanak *S. aureus* biofilma pri koncentraciji od 100 µg/mL, dok MIK nativnog kurkumina za *S. aureus* iznosi 187,5 µg/mL (Loo i sur., 2015)



Tablica 2. Prikaz polimernih nanočestica kurkumina i njihove antibakterijske aktivnosti

SASTAV NANOČESTICA	BAKTERIJA	Ispitivanje	REZULTATI	LITERATURA
<b>kitozan/tetrametilorto-silikat/PEG-400</b>	<i>P. aeruginosa</i> MRSA	<i>In vitro</i>	97%-tna redukcija rasta MRSA i 60%-tna redukcija rasta <i>P. aeruginosa</i>	Krausz i sur., 2015.
<b>Želatina</b>	<i>L. monocytogenes</i> <i>S. enterica</i> <i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>	<i>In vitro</i>	Povećanje topljivosti 38,6x	Gomez-Estaca i sur., 2017.
<b>PLA</b>	MRSA <i>S. mutans</i>	<i>In vitro</i>	Povećanje topljivosti i jači antimikrobni fotodinamički učinak na planktonske kulture nego na biofilmove	Trigo i sur., 2017.
<b>PLA/pektin</b>	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>	<i>In vitro</i>	Produženo oslobađanje i visoki kapacitet uklapanja kurkumina	Alippilakkotte i Sreejith, 2018.
<b>PVP</b>	<i>P. aeruginosa</i> <i>S. aureus</i>	<i>In vitro</i>	Sinergistički učinak srebrnih i kurkuminskih nanočestica na eradikaciju biofilмова	Loo i sur., 2015.
<b>PLGA</b>	<i>S. saprophyticus</i> <i>subsp. bovis</i> <i>E. coli</i>	<i>In vitro</i>	Redukcija održivosti <i>S. Saprophyticus subsp. bovis</i> za 99,9% i <i>E. coli</i> za 97,75%	Preis i sur., 2019.

PEG-400, polietilenglikol 400; PLA, polimljična kiselina; PLGA, kopolimer mliječne i glikolne kiseline; PVP, polivinilpirolidon

### 4.2.2.3. HIDROGELOVI

Osim prethodno navedenih polimernih nanokompozita i nanočestica formulirani su i različiti hidrogelovi s ciljem potenciranja terapijske uporabe kurkumina. Razvijena je nova formulacija hidrogela od nanočestica srebra s kurkuminom kako bi se poboljšala uporabljivost navedenih tvari. Matriks hidrogela sintetizira se polimerizacijom akrilamida u prisutnosti natrijeve soli polivinilsulfonske kiseline (PVSA) te umreživača (2,4,6-trialiloksi 1,3,5-triazin, TA) u reducirajućem okruženju (amonijev persulfat/tetrametiletilendiamin). Srebrne nanočestice proizvedene su uklapanjem srebrnih iona u hidrogel i redukcijom s natrijevim borhidridom. Kurkumin je uklopljen mehanizmom difuzije tako da je hidrogel bubrio u vodeno-etanolnoj otopini kurkumina kroz 24 sata u mraku zbog fotosenzitivnosti polifenola. Usporedbom antibakterijskog učinka na *E. coli* samog hidrogela, hidrogela s Ag<sup>+</sup> ionima, hidrogela sa srebrnim nanočesticama i formulacije kurkumina uklopljenog u hidrogel sa srebrnim nanočesticama, pokazana je najveća redukcija rasta *E. coli* djelovanjem formulacije hidrogela sa srebrnim nanočesticama kurkumina. Zbog prisutnosti većeg broja srebrnih nanočestica i kurkumina, PVSA 5 hidrogel koji je sadržavao 0,10 g PVSA i 2,00 x10<sup>-4</sup> mM TA inhibirao je čak 90% rasta bakterije, dok su ostali hidrogelovi inhibirali samo 25% rasta *E. coli*. Ovo istraživanje je pokazalo da se kombinacijom hidrogela, nanotehnologije i prirodnog spoja kurkumina može dobiti formulacija zadovoljavajućeg antimikrobnog učinka u liječenju opeklina. Uklapanjem kurkumina u nanočestice u hidrogelu dolazi do poboljšanja njegovog antibakterijskog učinka i postiže se produženi terapijski učinak zbog kontinuiranog oslobađanja kurkumina i srebra (Varaprasad i sur., 2011). Sattari i suradnici (2018) formulirali su hidrogel baziran na interpenetriranim polimernim mrežama gdje primarnu mrežu čini poliaspartanska kiselina umrežena grafitnim nanopločama, a sekundarnu mrežu čini poli(akril amid-ko-akrilna kiselina). Unutar matriksa gela uklopljene su nanočestice srebra, bakrova oksida i cink-oksida. Kurkumin je inkorporiran u hidrogel metodom bubrenja tako da su „suhi hidrogelovi“ bili namočeni u 50 mL otopine kurkumina (2:8=etanol:destilirana voda) i nakon toga isprani vodom kako bi se uklonio površinski adsorbiran kurkumin. Povećanjem sadržaja srebrnih nanočestica, a time i veličine pora u hidrogelu, poboljšano je uklapanje kurkumina zbog većeg širenja polimerne mreže. Suprotno tomu, većim brojem nanočestica cinkova i bakrova oksida smanjuje se kapacitet uklapanja kurkumina zbog manjeg bubrenja interpenetriranih polimernih mreža. Prisutnost nanočestica u hidrogelu omogućila je stabilnost i sporije oslobađanje kurkumina, dok je pri fiziološkom pH oslobađanje ipak bilo veće radi jačih elektrostatskih odbijanja i redukcije

vodikovih veza među ionskim grupama. Antibakterijska aktivnost hidrogelova ispitana je izlaganjem *S. aureus* i *E. coli* istoj količini hidrogelova (20 mg) u fiziološkoj otopini tijekom 12 sati. Formulacije su pokazale da je antimikrobni učinak na navedene bakterije ovisan o tipu metalnih nanočestica, brzini oslobađanja kurkumina i tipu bakterije. Hidrogel sa srebrnim nanočesticama pokazao je značajno veći antibakterijski učinak na *E. coli* od onog koji je sadržavao nanočestice cinkovog ili bakrovog oksida. Tuan i suradnici (2018) pripravili su injektibilni kitozan-g-poloksamerni hidrogel baziran na nanokurkuminu i termosenzitivnim poloksamer 407 kitozanskim kopolimerima te su ispitali njegovu učinkovitost u liječenju opekline trećeg stupnja. Kitozan koji se inače koristi u terapiji opekline postiže sinergistički učinak u kombinaciji s kurkuminom koji smanjuje aktivnost oksidativnih radikala i stimulira fibroblaste. Kako bi povećali terapijsku učinkovitost kurkumina znanstvenici su metodom ultrasonikacije sintetizirali nanokurkumin u termoosjetljivoj otopini kitozana i poloksamera F127. Pri višoj temperaturi došlo je do geliranja otopine. Ispitivanjem antimikrobne aktivnosti nanokurkumin-kitozanskog hidrogela na bakterijama *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *P. aeruginosa* i *S. aureus* dokazana je veća učinkovitost formulacije na navedene Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije od otopine kurkumina. Vrijednosti MIK-ova nativnog kurkumina za *E. coli*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa* i *S. aureus* iznosile su 1, 6, 4, 2 i 0,96 dijelova na milijun (ppm), a MIK-ovi nanokurkumin-kitozan hidrogela 3,0 mg/mL (0,32 ppm kurkumin), 4,5 mg/mL (0,48 ppm kurkumin), 0,75 mg/mL (0,08ppm kurkumin) i 1,5 mg/mL (0,16 ppm kurkumin). Zahvaljujući sinergističkom učinku i pojačanoj antimikrobnoj aktivnosti ova formulacija se pokazala perspektivnom za liječenje opekline.

#### **4.2.2.4. POLIMERNE MICELE**

Rahbar i suradnici (2019) istražili su učinak kurkumina u micelarnim nanočesticama u kombinaciji s ciprofloksacinom na ekspresiju *mexX* i *oprM* gena u izolatima *P. aeruginosa* rezistentnima na ciprofloksacin. Kurkumin je uklopljen u micelarne nanočestice (monometoksi poli(eilenglikol)olata) u omjeru 1:10 (kurkumin:nanočestice). Kultura *P. aeruginosa* je tretirana ciprofloksacinom ili kombinacijom antibiotika s kurkuminskim micelarnim nanočesticama te je ekspresija *mexX* i *oprM* gena mjerena testom lančane reakcije polimeraze (PCR) u realnom vremenu. Veće smanjenje ekspresije uočeno je kod kombinacije kurkumina i antibiotika nego kod samog antibiotika. Micelarni kurkumin (400 µg/mL) inducirao je smrt u 50% izolata tretiranih s ciprofloksacinom kroz 24 sata, dok rast bakterija tretiranih samo ciprofloksacinom

(bez kurkumina) nije bio inhibiran. Spektrofotometrijskom analizom uočeno je povećanje koncentracije antibiotika u bakterijskoj stanici kao posljedica povećanja sadržaja kurkuminskih micelarnih nanočestica jer se smanjio broj efluksnih pumpi na površini stanice. Rezultati istraživanja pokazali su da se kurkumin može koristiti u tretiranju izolata rezistentnih na ciprofloksacin jer smanjuje ekspresiju gena vezanih uz efluksne pumpe te pojačava prijanjanje antibiotika na bakterije i njegovu učinkovitost.

Kako bi poboljšali loša fizikalno-kemijska svojstva kurkumina, metodom hidratacije tankog filma Akbar i suradnici (2018) formulirali su miješane polimerne micidele s uklopljenim kurkuminom. Korištenjem biokompatibilnih i biorazgradljivih polimera poput kitozana, natrijeva alginata i maltodekstrina s poloksamerom (PF127 i P123) kurkuminu je povećana stabilnost, kapacitet uklapanja i topljivost u vodi te omogućen produženi terapijski učinak u usporedbi s nativnim kurkuminom i polimernim micelama sastavljenima samo od poloksamera. *In vitro* studije pokazale su značajno veći antikancerogeni, antimikrobni i antioksidativni učinak miješanih polimernih micela u usporedbi s kurkuminom i/ili praznim micelama (bez kurkumina). S obzirom na činjenicu da nisu zapažene interakcije kurkumina i polimera zaključeno je da polimeri osim produženja terapijskog potencijala kurkumina imaju i važnu ulogu u očuvanju integriteta kurkumina. Prosječne vrijednosti MIK-ova za *E. coli* i *S. aureus* iznosile su 350 i 275 µg/mL što potvrđuje da miješane polimerne micidele s kurkuminom imaju jači antibakterijski učinak od slobodnog kurkumina.

### **4.2.3. SURFAKTANTNE NANOFORMULACIJE**

#### **4.2.3.1. NANOEMULZIJE**

S ciljem poboljšanja topljivosti tetrahidroksi kurkumina izrađena je U/V nanoemulzija tehnikom homogenizacije pod visokim tlakom. Zavojni materijal namijenjen za lokalno tretiranje opekline impregniran je nanoemulzijom sa česticama veličine 100-300 nm i sadržajem kurkumina oko 83% uz korištenje ciklodekstrina i polikarboksilne kiseline kao sredstava za umrežavanje. Uočena je veća učinkovitost formulacije na *B. subtilis* i *E. coli*, a maksimalnu inhibiciju u periodu od 15 min pokazala je 0,5%-tna nanoemulzija na 100 °C. Omjer ulja i surfaktanta 1:1 pokazao se najprikladnijim pri oblikovanju formulacije, dok se korištenjem sve većeg tlaka smanjila veličina čestica i posljedično povećala površina kurkumina za uklapanje u nanoemulziju. Pri tlaku od 400 bara sadržaj kurkumina iznosio je

81%, a povišenjem tlaka na 800 bara porastao je na 83%. Dokazano je da najveći utjecaj na zone inhibicije Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija pokazuju koncentracija, temperatura i vrijeme kontakta bakterija s formulacijom (Kole i sur., 2018). Slično prethodnom istraživanju, Gotmare i suradnici (2018) također su metodom homogenizacije pri visokom tlaku izradili nanoemulziju tetrahidroksi kurkumina prosječne veličine čestica 101 nm i sadržajem tvari oko 83%. Materijal tretiran s nanoemulzijom pokazao je izvrsni antibakterijski učinak na *B. subtilis* i *E. coli*. 0,5%-tna emulzija reducirala je rast *B. subtilis* (93,5%) i *E. coli* (92%), što je više od učinka 0,3 i 0,1%-tnih emulzija. Na tragu prethodnih studija, Kaur i suradnici (2017) su metodom ultrasonikacije formulirali U/V nanoemulziju polifenona 60 (P60) i kurkumina koja je sadržavala sojino ulje, Tween 20, propilenglikol i vodu. Korištenjem sojinog ulja postigla se manja veličina čestica (51 nm) zbog njegove niske viskoznosti u odnosu na lecitin (74,6 nm). Dodatkom kitozana otopljenog u ledenoj octenoj kiselini u ulozi gelirajuće tvari, nanoemulzija je preformulirana u gel. Intravaginalnom primjenom gela na animalnom modelu (štakori) uočen je veći unos kurkumina u ciljane organe (bubreg i mokraćni mjehur) te zadržavanje pripravka na mjestu primjene (vaginalnoj sluznici) do 24 sata, za razliku od oralno i intravaginalno primijenjene nanoemulzije u izvornom, tekućem obliku. Nanoemulzija kurkumina u gelu pokazala je inhibiciju rasta uropatogene *E. coli* kroz 5 sati, a *in vitro* studije permeacije potvrdile su naglu permeaciju nanoemulzije u simuliranom vaginalnom mediju nakon perioda od pola sata. Vrijednosti MIK-a P60 i kurkumina iznosile su 3,3 i 0,3 mg/mL, a njihovom kombinacijom te vrijednosti su se smanjile na 0,83 i 0,07 mg/mL, potvrđujući tako značajno veću učinkovitost na *E. coli* u usporedbi s njihovom individualnom aktivnosti. Uklapanjem ovih prirodnih antimikrobnih tvari u nanoformulaciju nadvladana je njihova loša topljivost i permeabilnost, brza sistemska eliminacija i enzimska degradacija *in vivo*. Intravaginalna primjena formulirane nanoemulzije omogućila je ciljanu dostavu do željenih organa te inhibiciju enzimske razgradnje u gastrointestinalnom traktu.

Asabuwa i suradnici (2018) formulirali su kurkuminsku Pickering emulziju stabiliziranu aminiranim celuloznim nanočesticama iz U/V emulzije kako bi savladali nedostatke i poboljšali bioraspoloživost kurkumina. Homogenizacijom organske faze koja je sadržavala Tween 80 i trigliceride srednje dužine lanca te hidrofilne vodene faze s aminiranim celuloznim nanočesticama nastale su fine kapljice stabilizirane nanocelulozom uz brzu difuziju surfaktanta iz uljne u vodenu fazu. Prosječna veličina čestica bila je  $\leq 150$  nm s uspješnosti uklapanja od približno 90%. U daljnjem tijeku istraživanja promatran je utjecaj koncentracije aminiranih celuloznih nanočestica, vremena skladištenja i pH na stabilnost Pickering emulzije. Povećanje koncentracije čestica i duže vrijeme skladištenja pokazali su pozitivan utjecaj na stabilnost

emulzije kao i različite vrijednosti pH pri kojima čestice emulzije ne agregiraju. Antibakterijski učinak Pickering emulzije kurkumina (koncentracije 1 mg/mL) ispitan je difuzijskom metodom na *S. aureus* (+), *S. epidermidis* (+), *E. faecalis* (+) i *E. coli* (-) te su zone inhibicije iznosile 9,8, 14, 12,8 i 9,9 mm. Jača aktivnost postignuta je na Gram-pozitivne bakterije koje sadrže vanjski peptidoglikanski sloj nasuprot Gram-negativnih bakterija karakteriziranih fosfolipidnom membranom kao vanjskim slojem. Maksimalna redukcija od 89% uočena je kod Gram-pozitivne *S. epidermidis*, a minimalna kod Gram-negativne *E. coli* (62%). Osim odlične antimikrobne aktivnosti, Pickering emulzija omogućila je i produženo oslobađanje kurkumina.

### 4.3. ANTIVIRUSNO DJELOVANJE KURKUMINA

Kurkumin posjeduje i izraženo antivirusno djelovanje na različite vrste virusa hepatitisa, influence i arbovirusa poput *Zika* (ZIKV) i *Chikungunya* (CHIKV) virusa. Osim navedenih, ovaj polifenol inhibira virus humane imunodeficijencije (HIV), *herpes simplex virus tip 2* (HSV-2) i humani papiloma virus (HPV) čime reducira širenje spolno prenosivih bolesti. Mehanizmi djelovanja kurkumina su brojni te obuhvaćaju inhibiciju ulaska virusa u stanicu (HCV, CHIKV, ZIKV), inhibiciju replikacije (virus hepatitisa B, respiratorni sincicijski virus (RSV)), inhibiciju genske ekspresije (HPV, HSV-2) te inhibiciju proteaze i integraze (HIV) (Praditya i sur., 2019). U Tablici 3 prikazane su nanoformulacije kurkumina s antivirusnim djelovanjem. Istraživanja su pokazala da kurkumin reagira s gotovo 30 proteina uključujući DNA polimerazu, kinazu fokalne adhezije, tioredoksin reduktazu, protein kinazu, lipoksigenazu i tubulin. Antiviralni mehanizam kurkumina obuhvaća moduliranje signalnih puteva u stanici (transkripcijski nuklearni faktor *kappa B*), upale i transkripcije/translacije. Osim moduliranja staničnih događaja on limitira virusnu infekciju interferirajući s kritičnim koracima u replikacijskom ciklusu koji uključuju vezanje virusa i replikaciju genoma. Virucidno djelovanje kurkumina postiže se narušavanjem integriteta ovojnice virusa (Mathew i Hsu, 2018).

Tablica 3. Nanoformulacije kurkumina s antivirusnim djelovanjem

Nanoformulacija (sastav)	Virus	Ispitivanje	Rezultati	Literatura
Liposomi (DMPC/DMPG/Chol)	<i>Epstein-Barr virus</i>	<i>In vitro</i> (EBV-transfomirani humani B-limfociti)	Jednaka ili jača inhibicija proliferacije B-limfocita transfomiranih <i>Epstein-Barr virusom</i> u odnosu na otopinu kurkumina	Chen i sur., 2019.
Micelle*	HCV	<i>In vitro</i> (Huh7,5 stanice)	Veće smanjenje titra virusa u odnosu na kontrolu	Naseri i sur., 2017.
Nanočestice (AgNO <sub>3</sub> )	RSV	<i>In vitro</i> (Hep-2 stanice)	Smanjenje titra virusa za dva reda magnitude te smanjena ekspresija citokina i interleukina	Yang i sur., 2016.
Nanočestice (apotriferin)	HIV	<i>In vitro</i> (SUPT1 stanice i stimulirane PBMC)	Veća specifičnost i potentnost (3x) te manja toksičnost u odnosu na topljivi kurkumin	Gandapu i sur., 2011.
Nanočestice (efavirenz, laktoferin)	HIV	<i>In vivo</i> (štakori)	Povećanje sigurnosti, biorasploživosti i protuupalnog učinka u odnosu na zasebno primijenjen kurkumin i efavirenz	Lakshmi i sur., 2016.
Nanokompozit (kitozan, TPP)	HCV	<i>In vitro</i> (Huh7 stanice HCV-4a pozitivnih pacijenata)	Smanjenje ekspresije proteina HCV-a u usporedbi s kurkuminom i nanočesticama kitozana	Loutfy i sur., 2021.
Nanokompozit (grafitni oksid, β-ciklodekstrin)	RSV	<i>In vitro</i> (Hep-2 stanice)	Smanjenje titra virusa za 4 reda magnitude s antivirusnom aktivnosti ovisnom o dozi	Yang i sur., 2017.
Nanokristali kurkumina	HCV	<i>In vivo</i> (miševi) <i>In vitro</i> (Huh7,5 stanice)	Povećanje biorasploživosti i terapijskog učinka, inhibicija ulaska najvažnijih genotipova HCV-a	Anggakusuma i sur., 2013.

AgNO<sub>3</sub>, srebrov nitrat; Chol, kolesterol; DMPC, dimiristoil-fosfatidilkolin; DMPG, dimiristoil-fosfatidilglicerol; EBV, *Epstein-Barr virus*; Hep-2, humane epitelne larinks (tumorske) stanice; Huh7 i Huh7,5, stanična linija hepatocelularnog karcinoma; PBMC, mononuklearne stanice periferne krvi; SUPT1, limfoblastični limfom T-stanica; TPP, tripolifosfat.

\*Nije naveden sastav micela.

### 4.3.1. LIPIDNE NANOFORMULACIJE

U svojem istraživanju, Chen i suradnici (2009) pripremili su tri različite formulacije liposoma s kurkuminom: dimiristoil-fosfatidilkolin (DMPC)/dimiristoil-fosfatidilglicerol (DMPG)/kolesterol/kurkumin=7/1/8/0,5, DMPC/DMPG/kolesterol/kurkumin=70/10/80/0,5 i DMPC/DMPG/kolesterol/kurkumin=70/10/80/1,5. Osim liposoma s kurkuminom, pripremljeni su i prazni liposomi (bez kurkumina) koji su u *in vitro* ispitivanjima pokazali toksičnost DMPC-a i DMPG-a na testiranim stanicama. No, dodatkom kolesterola lipidima u molarnim omjerima DMPC/DMPG/kolesterol=7/1/8 gotovo se potpuno eliminirala toksičnost navedenih lipida. Nakon inkubacije kurkumina u fosfatnom puferu 180 minuta, ispitivanjem stabilnosti preostalo je samo 16% kurkumina. Njegovim uklapanjem u liposome značajno je poboljšana stabilnost, najviše korištenjem liposoma (fosfo)lipidnog sastava DMPC/DMPG/kolesterol/kurkumin=70/10/80/0,5 gdje je očuvano 100% sadržaja. Liposomski kurkumin inhibirao je proliferaciju B-limfocita transformiranih *Epstein-Barr virusom* podjednako ili jače od slobodnog kurkumina (otopine), pokazujući tako da se uklapanjem kurkumina u lipidne nanoformulacije postiže njegov jači immunosupresivni i antivirusni učinak. Ova studija pokazala je kako intravenska primjena liposomskog kurkumina može povećati bioraspodivnost i učinkovitost polifenola što bi u konačnici moglo rezultirati kliničkom primjenom kurkumina.

### 4.3.2. POLIMERNE NANOFORMULACIJE

#### 4.3.2.1. NANOMICELLE

Uklapanjem teško topljivog kurkumina u micelle poboljšava se njegova topljivost i apsorpcija u gastrointestinalnom traktu. Naseri i suradnici (2017) istraživali su antiviralni učinak kurkuminskih nanomicela prilikom vezanja i ulaska čestica HCV-a u stanicu. Osim toga, MTT testom ispitana je citotoksičnost nanomicela kurkumina i nanomicela PEG-iliranog interferona kao kontrole na Huh7,5 stanicama u kojima se HCV može učinkovito replicirati. Izlaganjem Huh7,5 stanica maksimalnoj koncentraciji PEG-iliranog interferona u nanomicelama od 0,8 mg/mL vrijednost koncentracije koja uzrokuje 50%-tnu inhibiciju ( $IC_{50}$ ) iznosila je 0,03 mg/mL, dok je izloženost nanomicelama kurkumina pri maksimalnoj



koncentraciji 0,26 mg/mL rezultirala vrijednošću  $IC_{50}$  od 0,16 mg/mL. Rezultati PCR testa u realnom vremenu pokazali su da je titar virusa u kontroli virusa, nanomicelama PEG-iliranog interferona i nanomicelama kurkumina bio 1250, 4000 i 1000 IU/mL. Kurkuminske nanomicele pokazale su smanjenje titra virusa u odnosu na kontrolu kod stanica inficiranih HCV-om što ukazuje da kurkuminske nanomicele imaju jači antiviralni učinak povezan s kasnijim fazama replikacije HCV-a.

#### 4.3.2.2. NANOČESTICE

Provedena su brojna istraživanja o utjecaju uklapanja kurkumina u nanočestice na njegovu antivirusnu aktivnost. Iako kurkumin pokazuje učinak na veliki broj virusa, Yang i suradnici (2016) ispitivali su njegovo djelovanje na RSV. Prosječna veličina RSV-a tretiranog sa srebro-kurkumin nanočesticama iznosila je oko 194 nm, što je značajno više od veličina nanočestica i virusa zasebno te upućuje na direktno vezanje kurkuminskih nanočestica na glikoproteine ovojnice virusa. Citopatski efekt je uočen kod humanih epitelnih larinks stanica (Hep-2) inficiranih RSV-om, dok je kod stanica zaraženih RSV-om koji je sat prije bio inkubiran sa srebrnim nanočesticama kurkumina rijetko prisutan. Usporedbom kurkuminsko-srebrnih nanočestica i srebrnih nanočestica sintetiziranih konvencionalnom metodom s limunskom kiselinom uočeno je da nanočestice srebra i kurkumina smanjuju titar virusa za dva reda magnitude, dok potonje samo za jedan red magnitude. Uz glavni mehanizam djelovanja nanočestica, direktnu inaktivaciju RSV-a prije staničnog ulaska, PCR u realnom vremenu pokazao je da opisana formulacija može značajno smanjiti ekspresiju citokina interleukina 6 (IL-6) i IL-1 $\beta$  u stanicama. Nanočestice kurkumina i srebra pokazale su bolju stabilnost i antiviralnu aktivnost od konvencionalnih srebrnih nanočestica s limunskom kiselinom.

Uz prethodno navedene srebrne čestice, formulirane su i laktoferinske nanočestice s uklopljenim kurkuminom kao preventivnim i protektivnim agensom te efavirenzom (antiviralni lijek). Čestice sferičnog oblika raspona veličina 40-70 nm pripremljene su kako bi se nadvladala loša topljivost efavirenza i kurkumina te postigao sinergistički učinak uklopljenih tvari s nosačem (laktoferinom). Kurkumin osim svojeg protuupalnog djelovanja inhibira HIV-1 replikaciju vezanjem za integrazu i proteazu, efavirenz inhibira reverznu transkriptazu, a laktoferin blokira ulazak virusa u stanicu. Efavirenz-kurkumin laktoferinske nanočestice pokazale su produženo oslobađanje kurkumina i efavirenza kroz 8-12 sati u odnosu na slobodan oblik gdje je 70% uklopljenih tvari velikom brzinom eliminirano s mjesta primjene. Postotak

uklapanja kurkumina od 63% i efavirenza od 62% u nanočestice bio je značajno veći od kapaciteta uklapanja navedenih tvari u pojedinačne nanočestice (kurkumin: 59%; efavirenz: 58%). Istraživanjima na animalnom modelu (štakorima) uočeno je da ovako formulirane nanočestice dostavljaju 88-124% više efavirenza i kurkumina od zasebno ili u kombinaciji primijenjenih kurkumina i antivirusa. Smanjenje količine kurkumina i efavirenza za pola rezultiralo je maksimalnom aktivnošću od 98% čime je jasno dokazana prednost nanočestica koje s manjim količinama uklopljenih tvari uzrokuju manje nuspojave i toksičnih učinaka. Zaključno, laktoferinske nanočestice s uklopljenim kurkuminom i efavirenzom imaju značajno veću sigurnost i biorasploživost te su učinkovita formulacija u liječenju HIV-a (Lakshmi i sur., 2016).

Gandapu i suradnici (2011) formulirali su nanočestice apotransferina s uklopljenim kurkuminom (500 mg/mg proteina apotransferina) i ispitali učinkovitost tako pripremljene nanofomulacije u inhibiciji replikacije HIV-a. Nanočestice su polagano oslobađale kurkumin, pri čemu je nakon 6 sati i dalje u nanočesticama preostalo 50% polifenola. S druge strane, intracelularni topljivi kurkumin je postigao maksimum nakon 2 sata i potpuno je eliminiran nakon 4 sata. Kurkumin je s vrijednosti koncentracije koja inhibira proliferaciju 50% stanica ( $GI_{50}$ ) 15,6 mM bio dva puta toksičniji od nanočestica kurkumina ( $GI_{50}=32,5$  mM). Iz  $IC_{50}$  vrijednosti nanokurkumina ( $IC_{50}=1,75$  mM) uočena je 3 puta veća potentnost nanofomulacije od otopine kurkumina ( $IC_{50}=5,1$  mM). Osim poznatih prednosti nanofomulacija poput prikladne veličine za lakšu internalizaciju, dobre topljivosti u vodi i veće biorasploživosti ova formulacija s apotransferinom pokazala je visoku specifičnost jer stanice inficirane HIV-om ekspimiraju transferinske receptore pomoću kojih nanokurkumin ima olakšani stanični ulazak. *In vivo* istraživanja pokazala su da nanokurkumin inhibira HIV-1 induciranu ekspresiju topoisomerase 2 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i ciklooksigenaze 2 te proviralnu DNA sintezu, što topljivi kurkumin ne čini. Formulacija kurkumina uklopljenog u apotransferinske nanočestice pokazala je visoku učinkovitost u inhibiciji HIV replikacije *in vitro* zahvaljujući receptorima posredovanoj endocitozi.

#### **4.3.2.3. NANOKOMPOZITI**

Loutfy i suradnici (2021) formulirali su metodom ionskog geliranja nanočestice kitozana i kitozansko-kurkuminski nanokompozit kojima je ispitana anti-HCV aktivnost na stanicama hepatoblastoma korištenjem PCR testa u realnom vremenu i Western blot testa.

Nanokompozit je pripremljen otapanjem kurkumina u etanolu i njegovim inkubiranjem s kitozanskim nanočesticama pri čemu dolazi do vezanja kurkumina na nanočestice. Otapalo je uklonjeno iz sustava, čime je dobiven suhi produkt. Modeli jetrenih Huh7 stanica HCV pozitivnih pacijenata tretirani su netoksičnim dozama kurkumina, kitozanskih nanočestica i nanokompozita. *In silico* studije pokazale su porast afiniteta formuliranog nanokompozita prema nestrukturinom proteinu 5B (NS5B) polimerazi HCV-a u usporedbi s kurkuminom što ga čini obećavajućim kandidatom u liječenju virusnih infekcija. Elektrostatske interakcije hidroksilne skupine kurkumina s amino skupinom kitozanskih nanočestica i njihovo umrežavanje s tripolifosfatom (TPP) rezultiralo je malom veličinom čestica (30-40 nm) za razliku od nanočestica formiranih korištenjem natrijevog alginata kao umreživača (100 nm). Osim smanjenja veličine čestica, TPP je zaslužan i za sporo oslobađanje kurkumina (180 minuta) čime se može objasniti slabiji citotoksični učinak formuliranog nanokompozita u odnosu na nativni kurkumin. Formulirani nanokompozit kurkumina i kitozana imao je najveći antivirusni učinak na ulazak ili replikaciju HCV-a.

#### **4.3.3. OSTALE NANOFORMULACIJE**

Osim prethodno opisanih polimernih nanoformulacija, razvijen je i kompozit grafitnog oksida funkcionaliziran  $\beta$ -ciklodekstrinom čime je poboljšano uklapanje kurkumina (65%). Antivirusno djelovanje formulacije ispitano je na RSV-u te se pokazalo da nanoformulacija kurkumina inaktivira RSV prije ulaska virusa u stanicu domaćina (sprječava njegovo vezanje za stanicu). Izuzev terapijskog djelovanja, formulacija je pokazala i blago profilaktičko djelovanje. Također, dokazan je i njezin učinak na ekspresiju G proteina koji je odgovoran za vezanje virusa na ciljanu membranu stanice tako što je tretiranjem RSV-a nanokompozitom značajno reducirana ekspresija glikoproteina ovojnice u odnosu na Hep-2 stanice zaražene virusom. Inkubacija RSV-a s 1,25  $\mu\text{g/mL}$  grafitnog oksida i kurkumina značajno je reducirala titar virusa, dok pri koncentraciji formulacije od 2,5  $\mu\text{g/mL}$  nije uočen titar, odnosno virus je izgubio svoju sposobnost inficiranja stanica. Kurkumin i  $\beta$ -ciklodekstrin funkcionalizirani kompozit grafitnog oksida smanjio je titar virusa za 4 reda magnitude s antivirusnom aktivnosti ovisnom o dozi. Ova nanoformulacija kurkumina s 3 različita mehanizma djelovanja (inaktivacija, inhibicija vezanja i ometanje replikacije virusa) pokazala se obećavajućom u liječenju RSV infekcija (Yang i sur., 2017).

Anggakusuma i suradnici (2013) formulirali su nanokristale kurkumina te pokazali da se uklapanjem polifenola u ovu nanoformulaciju postiže njegova bolja bioraspoloživost i smanjen klirens. Farmakokinetičkom studijom uočeno je da nanokurkumin ima više koncentracije u plazmi u usporedbi s kurkuminom jer nakon 30 minuta postiže koncentraciju od 95 ng/mL (oralna primjena) i 126 ng/mL (intraperitonealna primjena). Čak i dva sata nakon primjene uočene su detektabilne količine kurkumina u krvnoj plazmi iz nanoformulacije. Novi pristupi dostavljanja lijekova, kojima pripadaju u ovom istraživanju spomenuti nanokristali, značajno povećavaju bioraspoloživost i terapijski učinak uklopljene tvari, u ovom slučaju kurkumina.

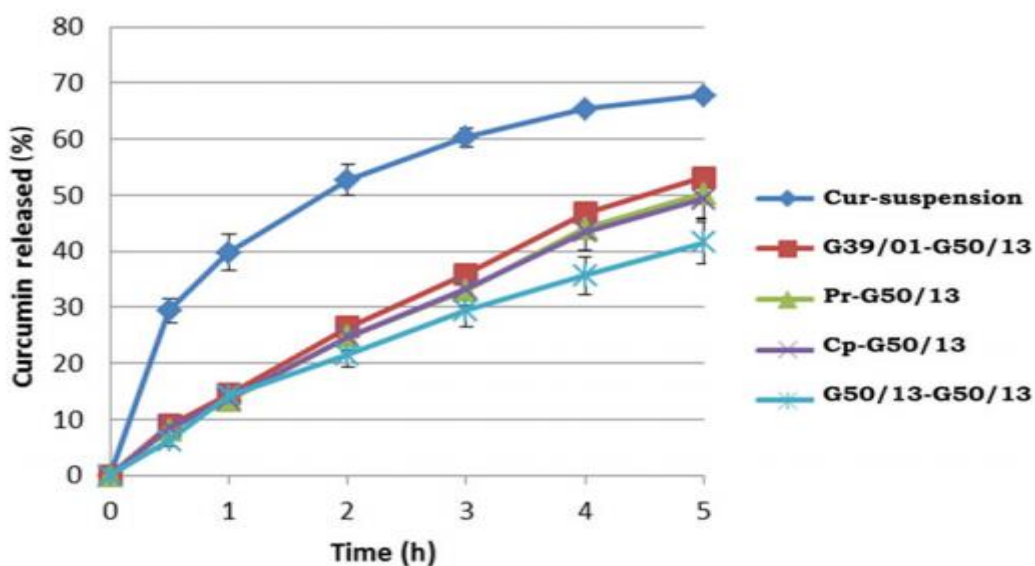
#### **4.4. ANTIFUNGALNO DJELOVANJE KURKUMINA**

Uz brojne farmakološke učinke, kurkumin također posjeduje antifungalni učinak na gljivice: *C. albicans*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus neoformans*, *Sporothrix schenckii*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* i druge. Izolati *P. brasiliensis* pokazali su se najosjetljivijima prema kurkuminu, dok redukcija rasta izolata roda *Aspergillus* nije bila značajna. Kurkumin se pokazao učinkovitiji od antimikotika flukonazola u inhibiciji adhezije vrste *Candida* na bukalne epitelne stanice (Martins i sur., 2008). Mogući mehanizam antifungalnog djelovanja kurkumina je smanjenje aktivnosti  $\Delta 5,6$  desaturaze koje dovodi do značajne redukcije ergosterola u stanicama gljiva. Redukcija ergosterola uzrokuje akumulaciju biosintetičkih prekursora ergosterola i staničnu smrt zbog stvaranja ROS-a (Sharma i sur., 2010). Osim ovog, postoje i drugi mehanizmi poput smanjenog stvaranja proteina, mijenjanja svojstva ATP-azne aktivnosti te inhibicije izbacivanja vodikovih ( $H^+$ ) iona i time zakiseljavanja stanica *Candida* vrste (Neelofar i sur., 2011; Khan i sur., 2012). Kurkumin pokazuje sinergistički učinak s amfotericinom B, flukonazolom, nistatinom, piperinom i askorbinskom kiselinom zbog čega ima veliki potencijal u poboljšanju postojeće antifungalne terapije (Zorofchian i sur., 2014).

##### **4.4.1. LIPIDNE NANOFORMULACIJE**

Kurkumin je uklapan u različite lipidne nanoformulacije kako bi se poboljšala njegova loša fizikalno-kemijska svojstva. Tako su Hazzah i suradnici (2015) formulirali SLN

kurkumina metodom vruće homogenizacije koristeći različite lipide poput Gelucire 39/01, Gelucire 50/13, Precirol-a, Compritol-a te poloksamera 407 kao surfaktanta. SLN kurkumina pokazale su dva puta veću antimikrobnu aktivnost u usporedbi s nativnim i kemijski stabiliziranim kurkuminom na vrstu *C. albicans*. Istraživanjem topljivosti kurkumina u SLN formulacijama različitih lipida uočen je najveći porast od 9% kod Gelucire 50/13 zbog njegovog hibridnog karaktera s polarnim i nepolarnim lancima. Osim topljivosti, navedeni lipid pokazao je i najbolji *in vitro* profil oslobađanja kurkumina (Slika 3). Prethodno je potvrđeno da su vrijednosti MIK-a kurkumina za različite sojeve *Candida* vrsta iznosile 0,2–0,5 mg/mL (Neelofar i sur., 2011), dok je u ovom istraživanju lipidna formulacija kurkumina pokazala veću antifungalnu aktivnost s MIK vrijednosti od 0,19 mg/mL. Stanice tretirane kurkuminskim SLN-om pokazale su heterogene nedefinirane fragmente bez ikakvih tragova čvrstih lipidnih nanočestica. Ta pojava je pripisana sposobnosti *C. albicans* da luči lipazu koja razgrađuje lipidni nosač i olakšava oslobađanje kurkumina iz nanoformulacije. Provedeno istraživanje dokazalo je da uklapanje kurkumina u SLN pridonosi očuvanju njegove stabilnosti te povećava antibakterijsku i antifungalnu aktivnost zahvaljujući maloj veličini čestica koja omogućuje bolji kontakt s patogenim stanicama rezultirajući s više interakcija i posljedično jačim terapijskim učinkom.



Slika 3. *In vitro* profili oslobađanja kurkumina iz SLN-a pripremljenih s različitim lipidima u usporedbi sa suspenzijom kurkumina (etanol:voda=1:1). Cp, Compritol; Cur, kurkumin; G, Gelucire; Pr, Precirol. Preuzeto iz Hazzah i sur. (2015), uz dozvolu izdavača (*Elsevier*).

## 4.4.2. POLIMERNE NANOFORMULACIJE

### 4.4.2.1. NANOČESTICE

Osim lipidnih formulacija, istraživane su i polimerne formulacije kurkumina u području antifungalne terapije. Paul i suradnici (2018) ispitivali su antifungalnu aktivnost srebrnih nanočestica s uklopljenim kurkuminom na flukonazol rezistentne sojeve *C. albicans* izolirane iz HIV pacijenata pomoću difuzijske i dilucijske metode. Rezultati su pokazali da srebrne nanočestice s kurkuminom imaju bolju antifungalnu aktivnost od otopine kurkumina i otopine srebrova nitrata korištenih kao kontrole. Promjeri zona inhibicije nakon primjene 50  $\mu\text{L}$  kurkuminskih nanočestica za *Candida glabrata* i *C. albicans* iznosili su 20,6 mm i 20,1 mm nasuprot znatno nižih 0,8 mm i 1 mm nastalih tretiranjem s 50  $\mu\text{L}$  otopine kurkumina. Porast antifungalnog učinka uočen je porastom koncentracije kurkumina pa je stoga 50  $\mu\text{L}$  nanočestica pokazalo značajno veće promjere zona inhibicije od 10 i 20  $\mu\text{L}$  kurkuminskih nanočestica sa srebrom. Nasuprot difuzijskoj, dilucijskom metodom je spoznato kolike iznose vrijednosti MIK-a nanoformulacije. MIK vrijednosti za *C. glabrata* i *C. albicans* iznosile su 31,2  $\mu\text{g/mL}$  i 62,5  $\mu\text{g/mL}$ , dok je slabiji učinak otkriven za *C. tropicalis* s MIK vrijednosti od 250  $\mu\text{g/mL}$ . Ova nanoformulacija kurkumina pokazala je izvrsnu antifungalnu aktivnost ovisnu o vrsti gljivica i koncentraciji kurkumina te je potencijalni kandidat u terapiji kandidijaze. Xue i suradnici (2019) formulirali su kurkumin fibroinske nanočestice veličine 85 nm. Polimer fibroin je prikladan materijal u dostavljanju lijekova zbog dobre biokompatibilnosti, dostupnosti i kontrolirane razgradnje. Fibroin (protein iz svile) je otopljen u heksafluoroizopropanolu i pomiješan s kurkuminom u omjeru 1: 2 te su pri tlaku od 20 MPa formirane nanočestice. Antifungalna aktivnost ispitana je na *C. albicans* i *Aspergillus* vrste. Premda fungicidni učinak na vrste *Aspergillus* nije potvrđen, MIK vrijednosti kurkumina i kurkumin-fibroin nanočestica za *C. albicans* iznosile su 128  $\mu\text{g/mL}$  i 64  $\mu\text{g/mL}$  što dokazuje jači antifungalni učinak nanoformulacije kurkumina. Provedena su i *in vivo* istraživanja na miševima zaraženim *C. albicans* kojima je injicirano 0.8 mg  $\text{kg}^{-1}$  kurkumina i kurkumin-fibroin nanočestica. Proučavanjem mortaliteta miševa uočeno je da su nakon tretiranja kurkuminom sve jedinke umrle nakon 4 dana, dok je 33,3% miševa tretiranih nanočesticama kurkumina i fibroina preživjelo narednih 7 dana. Daljnja istraživanja pokazala su da nanočestice inhibiraju adheziju *C. albicans* na površinu stanica i reduciraju stvaranje biofilмова uz posljedično puno učinkovitiji antifungalni učinak od nativnog kurkumina.

U drugom istraživanju, interakcijom kurkumina u ulozi reducensa s Ag<sup>+</sup> (srebrov nitrat) ionima pri pH 5 nastale su nanočestice koje su zbog prisutnosti glicerola pokazale usku distribuciju veličina. Srebrne nanočestice s kurkuminom prosječne veličine 13 nm stabilizirane su dodatkom polivinilpirolidona. Uočeno je da stvaranje nanočestica srebra i kurkumina linearno raste s koncentracijom kurkumina, dok se antifungalna aktivnost nanočestica pokazala boljom od aktivnosti penicilina i amoksicilina prema *Fusarium* vrsti. Promjer zone inhibicije za penicilin bio je < 10 nm, za amoksicilin 11,5 nm, dok su nanočestice uzrokovale najveći promjer od 12,5 nm (El Khoury i sur., 2015). Kako bi poboljšali svojstva kurkumina, Deka i suradnici (2016) formulirali su nanočestice korištenjem topljivog kitozan fosfata i TPP-a. Omjer TPP:kitozan fosfat=1:6 pokazao se optimalnim za pripremu nanočestica u koje se naknadno uklopila etanolna otopina kurkumina. Ispitana je antifungalna aktivnost kurkumina i kitozan-fosfatnih nanočestica s uklopljenim kurkuminom na *C. albicans*. Nanočestice su pokazale najjači antifungalni učinak i blago smanjenje MIK vrijednosti prema gljivici. Osim antimikrobne učinkovitosti, formuliranjem nanočestica postiglo se efikasnije uklapanje polifenola s maksimumom od 84%. Oslobođena je veća količina kurkumina pri kiselom pH (4) od fiziološkog pH (7,4) jer niži pH uzrokuje bubrenje matriksa uzrokovano protonacijom amino-skupine kitozanskog fosfata i lakše oslobađanje uklopljene tvari. Korištenjem kitozanskog fosfata umjesto kitozana u formuliranju nanočestica eliminirana je upotreba kiselih otapala poput octene, jantarne, mravlje i mliječne kiseline potrebnih za otapanje kitozana, dok je omjer kitozan fosfata i TPP-a 6:1 omogućio stvaranje maksimalnog broja nanočestica.

#### **4.4.2.2. NANOKOMPOZITI**

Tong i suradnici (2017) koristili su nanocelulozu, izvrstan materijal u tretiranju rana, kako bi sintetizirali film celuloznih nanokristala s kurkuminom. Naime, nanoceluloza, zahvaljujući svojoj sposobnosti dobrog sabijanja i apsorpciji eksudata iz rane, ima prednost pred tradicionalno korištenim materijalima (Moritz i sur., 2014). Vlakna nanoceluloze suspendirana su u 5%-tnom polivinil alkoholu, pomiješana s 50 µg kurkumina, nakon čega je smjesa homogenizirana 10 minuta i osušena na sobnoj temperaturi. U ispitivanju antimikrobnog učinka filma kurkumina te njegove kontrole, koju čine celulozni nanokristali bez kurkumina, korištene su Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije te dva kvasca (*C. albicans* i *Candida utilis*). Film kurkumina je pokazao široki spektar antimikrobne aktivnosti inhibirajući rast nekolicine bakterija i gljivice *C. albicans* s promjerom zone inhibicije od 25,7 mm. Svi testirani

mikroorganizmi pokazali su 99%-tnu redukciju rasta nakon tretiranja filmom kurkumina u usporedbi s kontrolom. Zbog nanokristala celuloze koji predstavljaju barijeru difuziji, kurkumin je postigao plato oslobađanja nakon 36 sati s ukupno oslobođenih ~99%. Zanimljivo je istaknuti da nakon tretiranja filmom kurkumina nije zapažen ponovni rast mikroorganizama uslijed kontroliranog oslobađanja kurkumina iz nanoformulacije.

#### 4.4.3. OSTALE NANOFORMULACIJE

S ciljem poboljšanja terapijskog djelovanja kurkumina formulirane su kurkuminske nanosfere antibakterijskog, antifungalnog, antioksidativnog i antikancerogenog djelovanja bez korištenja surfaktanta i polimernih nosača. Nanosfere su pripravljene metodom vlažnog mljevenja uz otparavanje otapala tako da je etanolna otopina kurkumina dodana u deioniziranu vodu i podvrgnuta sonikaciji. Ispitivana je *in vitro* antimikrobna aktivnost otopljenog kurkumina u DMSO-u i njegovih nanosfera na Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije te gljivicu vrste *Candida*. Uočen je znatno jači antifungalni učinak nanosfera kurkumina od otopine kurkumina koji se temelji na interakciji nanosfera s ergosterolom čija je sinteza inhibirana u membrani gljivica i dovela je do stanične smrti. Također, ispitana je *ex vivo* kolonizacija na koži svinje pri čemu je koža inficirana s inokulumom bakterija i gljivica ( $10^5$ – $10^7$  CFU). Nakon 30 minuta inkubacije, dijelovi kože tretirani su vodenom disperzijom nanosfera i kurkuminom otopljenim u DMSO. Redukcija rasta znatno većeg broja kolonija uočena je nakon primjene nanosfera u usporedbi s otopinom kurkumina (Arunraj i sur., 2014). U drugoj studiji, metodom vlažnog mljevenja kurkumin, mase 100 mg, otopljen je u diklormetanu te raspršen u vrućoj vodi uz korištenje ultrazvuka (100 W, 30 kHz). Miješanjem je dobivena narančasta otopina koja je ukoncentrirana pod sniženim tlakom i zatim prevedena u prašak postupkom sušenja raspršivanjem. Za razliku od kurkumina, nastali liofilizirani prašak kurkumina bio je u potpunosti topljiv u vodi, a pri njegovoj proizvodnji nisu korišteni stabilizatori niti surfaktanti. Nastale nanočestice kurkumina bile su veličine 2-40 nm te su puno bolje penetrirale u stanice od otopine kurkumina u DMSO-u (500-800 nm). Uspoređivanjem vrijednosti MIK-a za *A. niger* nanokristala kurkumina u vodi i kurkumina otopljenog u DMSO-u uočeno je da nanokurkumin ima manju MIK vrijednost (350 µg/mL) od otopine kurkumina (400 µg/mL). Redukcijom veličine praška kurkumina do nano-dimenzija znatno je poboljšana topljivost kurkumina u vodi i njegova antibakterijska i antifungalna aktivnost (Bhawana i sur., 2011).



Osim korištenja u terapijske svrhe, nanoformulacije kurkumina ispitivane su i u prehrambenoj industriji za zaštitu voća od razvoja gljivica tijekom njihovog uskladištenja. Primjerice, Yilmaz i suradnici (2016) su ispitivali antifungalni učinak nanovlakna zeina i kurkumina na gljivice *Botrytis cinerea* i *Penicillium expansum* koje se pojavljuju na jabukama poslije berbe. Otopina zeina, proteina kukuruza, pripravljena je njegovim otapanjem u 85%-tnom etanolu. Mješavine zeina i kurkumina (2,5 i 5% masenog udjela kurkumina u odnosu na masu zeina) podvrgnute su elektrorotaciji čime su dobivena cilindrična polimerna nanovlakna promjera manjeg od 350 nm. *In vitro* testovi antifungalne aktivnosti pokazali su 40-50%-tnu inhibiciju rasta micelija oba patogena s dva puta jačim učinkom na *P. expansum*. Usporedbom nanovlakana s kurkuminom koji nije uklopljen u formulaciju potvrđena je bolja antifungalna aktivnost nanoformulacije kurkumina, dok nije bilo značajne razlike u učinkovitosti nanovlakana s koncentracijama kurkumina 2,5% i 5% na ispitivane gljivice. Autori su zaključili da tako pripravljena kurkuminska nanovlakna predstavljaju novi ekološki pristup u prevenciji rasta gljivica prilikom skladištenja jabuka zahvaljujući svojoj biorazgradivosti i jestivosti u usporedbi sa sintetičkim fungicidima.

#### 4.5. ANTIPARAZITSKO DJELOVANJE KURKUMINA

Alkoholni ekstrakt kurkumina pokazao je antiprotozalno djelovanje na *Entamoeba histolytica* (Dhar i sur., 1968). Također, kurkumin je pokazao i antiparazitski učinak na vrste *Plasmodium*, *Leishmania*, *Trypanosoma* i *Giardia lamblia*, kako *in vitro*, tako i *in vivo*. Ovaj polifenol inducira hipoacetilaciju histona inhibiranjem histon acetiltransferaze istodobno stvarajući ROS. Mehanizam djelovanja na vrste *Toxoplasma* i *Plasmodium* obuhvaća inhibiciju unutarstaničnih adhezijskih molekula, dok kod vrste *Trypanosoma brucei* inhibira aktivnost metaloproteinaza. Glutation transferaza izolirana iz *P. falciparum* smatra se odgovornom za rezistenciju vrste na klorokin. Stoga je kurkumin kao potentni inhibitor glutation transferaze potencijalno rješenje za rezistenciju *Plasmodium* vrste na antimalarike (Subramani i sur., 2017). Aboueldahab i Elhussieny (2016) predložili su nekoliko mehanizama antiparazitskog djelovanja kurkumina koji dovode do smanjenja održivosti parazita poput redukcije fibroze, porasta oksidativnog/nitratnog stresa te fragmentacije DNA. Kurkumin u nanoformulacijama inhibira ekspresiju citokina IL-1 $\beta$  pokazujući istovremeno antiparazitski učinak i inhibicijski učinak na proinflamatorne citokine (Rai i sur., 2020).

## 4.5.1. LIPIDNE NANOFORMULACIJE

### 4.5.1.1. LIPOSOMI

Lipidne formulacije, poput liposoma, često su korištene za potenciranje antiparazitskog učinka kurkumina. Artemisinin, poznati antimalarik, Isacchi i suradnici (2012) uklopili su samog ili u kombinaciji s kurkuminom u konvencionalne i PEG-ilirane liposome te ispitali *in vivo* aktivnost proizvedenih formulacija na animalnom modelu (miševima) inficiranim *Plasmodium berghei*. U Tablici 4 prikazani su molarni omjeri sastavnica formuliranih lipidnih nanoformulacija. Miševi su tretirani dozom artemisinina 50 mg/kg/dan i kombinacijom artemisinina i kurkumina doze 100 mg/kg/dan. Artemisinin je reducirao parazitemiju tek 7 dana nakon primjene s velikim oscilacijama koncentracije u krvi, dok su konvencionalni (A-CL) i PEG-ilirani liposomi artemisinina (A-PL) te konvencionalni (AC-CL) i PEG-ilirani liposomi artemisinina i kurkumina (AC-PL) pokazali neposredni antimalarijski učinak. Zbog produljenog oslobađanja antimalarika uklopljenog u liposome uočena je značajno manja varijabilnost plazmatskih koncentracija artemisinina te su sve liposomske formulacije pokazale terapijsku učinkovitost. Tako su A-PL imali najizraženiji terapijski učinak s redukcijom parazitemije od 60% nakon samo 3 dana, dok je primjenom ostalih liposomskih formulacija postignuta redukcija bolesti veća od 93% nakon 5. dana terapije. Infekcija je u potpunosti izliječena 7 dana nakon terapije s A-CL te 5 dana nakon terapije s AC-CL, A-PL i AC-PL.

Tablica 4. Sastav liposoma s artemisininom i kurkuminom (molarni omjeri). Preuzeto i prilagođeno iz Isacchi i sur. (2012), uz dozvolu izdavača (*Elsevier*).

SASTAVNICA	A-CL	AC-CL	A-PL	AC-PL
P90G	5	1,6	5	1,6
KOLESTEROL	0,6	0,2	0,6	0,2
PEG2000-DSPE	-	-	0,25	0,1
ARTEMISININ	2	0,6	2	0,6
KURKUMIN	-	1	-	1

AC-CL, konvencionalni liposomi artemisinina i kurkumina; A-CL, konvencionalni liposomi artemisinina; AC-PL, PEG-ilirani liposomi artemisinina i kurkumina; A-PL, PEG-ilirani liposomi artemisinina; P90G, Phospholipon® 90 G; PEG2000-DSPE, polietilenglikol-2000-distearoilfosfatidiletanolamin

#### 4.5.1.2. ČVRSTE LIPIDNE NANOČESTICE (SLN) I NANOSTRUKTURIRANI LIPIDNI NOSAČI (NLC)

Uz liposome, kurkumin je uklapan i u druge lipidne nanoformulacije kako bi se postiglo njegovo snažnije antiparazitsko djelovanje. Lipidne nanočestice (SLN i NLC) s uklopljenim kurkuminom pripremljene su tehnikom nanoemulgiranja korištenjem homogenizatora visoke brzine i ultrazvučne sonde. Trimiristin, tristearin i gliceril monostearat korišteni su kao tekući lipidi, a trigliceridi srednje dužine lanca kao čvrsti lipidi. Prilikom formuliranja SLN-a korišteni su samo čvrsti lipidi, dok je za pripremu NLC-a korištena kombinacija čvrstih i tekućih lipida. Prednost korištenja ove metode je uporaba biokompatibilnih lipida, proizvodnja u vodenom mediju uz izbjegavanje organskih otapala, dobro uklapanje djelatne tvari i jednostavan proizvodni proces. Osim što omogućuju produženo oslobađanje kurkumina, ove lipidne nanoformulacije mogu biti primijenjene parenteralno čime zaobilaze gastrointestinalni trakt u kojem se odvija većina razgradnje kurkumina i jedan je od glavnih uzroka njegove loše bioraspoloživosti. Čestice su pokazale veću uspješnost uklapanja kurkumina povećanjem udjela triglicerida srednje dužine lanca u formulaciji koji su odgovorni za manju uređenost kristalne rešetke čvrstog lipidnog matriksa. *In vivo* ispitivanjem dokazana je 2 puta veća antimalarijska aktivnost (duži period preživljavanja miševa) kurkumina u lipidnim nanočesticama u odnosu na neuklopljeni kurkumin na miševima zaraženim *P. berghei*. Zanimljivo je istaknuti da čak i prazne lipidne nanočestice (bez djelatne tvari) imaju određen antimikrobni učinak. Naime, životinje tretirane praznim lipidnim nanočesticama ostale su žive 9-13 dana nakon primjene formulacije što se može pripisati derivatima ili esterima masnih kiselina (lecitin, trimiristin, tristearin, gliceril monostearat) koji pokazuju određenu antimalarijsku aktivnost *in vivo* i *in vitro*. SLN i NLC formulacije osigurale su veću koncentraciju kurkumina na ciljanom mjestu te zbog svega prethodno navedenog opravdavaju svoju uporabu kao nosača lijekova protiv malarije (Nayak i sur., 2010).

## 4.5.2. POLIMERNE NANOFORMULACIJE

### 4.5.2.1. NANOČESTICE

Akhtar i suradnici (2012) dokazali su da se kurkumin vezan za kitozanske nanočestice sporije razgrađuje ( $t_{1/2}=160$  minuta) u usporedbi sa suspenzijom kurkumina ( $t_{1/2}=25$  minuta) te da nanočestice bolje prolaze kroz intaktnu mukoznu barijeru pa su nakon samo sat vremena detektirane u krvi miševa. Kitozanske nanočestice pripremljene su metodom baziranom na elektrostatskim interakcijama kitozana i natrijevog TPP-a u omjeru 25:7,5. Nastale nanočestice inkubirane su s otopinama kurkumina te je pri pH=4 uočeno maksimalno vezanje kurkumina na kitozanske nanočestice (85,3  $\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$  kitozana). Rezultati provedenih ispitivanja su pokazali da kurkumin inhibira sintezu  $\beta$ -hematina u parazitima potentnije ( $\text{IC}_{50}=122 \mu\text{M}$ ) od antimalarika klorokina ( $\text{IC}_{50}=198 \mu\text{M}$ ). Tretiranje miševa zaraženih s *Plasmodium yoelii* kurkuminom u dozi od 1 mg/dan kroz 7 dana rezultiralo je preživljavanjem svega 1/3 miševa, dok su primjenom 1 mg kurkumina vezanog na kitozanske nanočestice svi miševi preživjeli. Nadalje, pokazano je da se oralnom primjenom kurkuminsko-kitozanskih nanočestica postiže produženo oslobađanje kurkumina kroz 8 sati nakon primjene, dok u slučaju samog kurkumina, razine u krvi značajno padaju nakon 3 sata i više nisu vidljive nakon 6 sati. Ovom formulacijom postignuta je veća kemijska stabilnost i bioraspoloživost kurkumina ( $c_{\text{max}}= 694 \text{ ng/mL}$ ) u usporedbi s otopinom kurkumina ( $c_{\text{max}}= 232 \text{ ng/mL}$ ).

Kombinacijom srebrnih, kitozanskih i kurkuminskih nanočestica postignuta je potpuna eradikacija trofozoita vrste *G. lamblia* iz crijeva. Kombinacija nanosrebra i nanokitozana pokazala je najveći sinergistički učinak (70,6%) uz redukciju rasta parazita od 90%, dok je miješanjem kurkumina i kitozana postignuta redukcija od samo 64%. Uočeno je da kombinirana terapija ima jači terapijski učinak od pojedinačne te da kombinacije nanočestica postižu bolje rezultate od kombiniranja nanočestica i nativnih spojeva. Kombiniranje nanočestica kurkumina, srebra i kitozana siguran je i učinkovit način antiparazitske terapije čak i u slučajevima s dijarejom jer kitozan produžuje vrijeme kontakta i odgađa napuštanje organizma (Said i sur., 2012). Poboljšanje antiparazitske aktivnosti kurkumina potvrđeno je i u istraživanjima koja su proveli Alam i suradnici (2016). Kurkumin je uklapan u različite dipeptidne nanočestice od kojih se fenilalanin- $\alpha,\beta$ -dehidrofenilalanin (F $\Delta$ F) pokazao optimalnim s obzirom na kapacitet uklapanja kurkumina (68%). Dipeptidne nanočestice inkubirane su s metanolnom otopinom kurkumina tijekom 72 sata, nakon čega je uslijedila liofilizacija nanoformulacije. Dok se 90%

kurkumina (kontrola) oslobodilo tijekom 9-10 sati, ovom formulacijom postignuto je znatno sporije oslobađanje polifenola od 80% kroz 90 sati. Kurkuminske FΔF nanočestice pokazale su 4 puta veću inhibiciju ( $IC_{50}=3,0 \mu M$ ) *P. falciparum* od kurkumina ( $IC_{50}=13 \mu M$ ). *In vivo* studija antimalarijske aktivnosti na albino miševima inficiranim *P. berghei* pokazala je produženi životni vijek i poboljšanu stopu preživljavanja kod miševa tretiranih kurkuminskim FΔF nanočesticama u usporedbi s onima tretiranim DMSO otopinom kurkumina.

Oyeyemi i suradnici (2018) provodili su istraživanje o primjeni PLGA nanočestica s uklopljenim kurkuminom i artesunatom u tretiranju unutarstaničnih patogena te uočili prednost nanočestica zbog kontroliranog oslobađanja uklopljenih djelatnih tvari. *In vivo* učinak na *P. berghei* ispitan je pri dozama od 5 i 10 mg/kg peti i osmi dan nakon primjene kurkumin-PLGA nanočestica. Redukcija rasta parazita bila je veća 5. dan (79%) nego 8. dan (73%) kod miševa tretiranih s 5 mg/kg kurkuminskih-PLGA nanočestica. Dokazan je učinak formulacije neovisan o dozi jer su nanočestice pokazale veću učinkovitost 5. dan pri nižoj dozi (5 mg/kg) u usporedbi s dva puta većom dozom (10 mg/kg). Stoga je ispitivana formulacija pokazala 10-30%-tno veće suzbijanje rasta parazita u odnosu na otopinu kurkumina i artesunata te njihove zasebne nanoformulacije. Velika učinkovitost pri malim koncentracijama kurkumina daje ovoj formulaciji značajnu prednost u terapiji malarije. S druge strane, Velasques i njegovi suradnici (2018) proučavali su uklapanje kurkumina i kinina u nanokapsule polikaprolaktona obložene polisorbatom 80. Oblaganje polimerom spriječilo je nestabilnost uklopljenih tvari izazvanu ultraljubičastim svjetlom, dok je njihova ko-inkapsulacija uzrokovala porast antimalarijske aktivnosti na sojeve *P. falciparum* osjetljive i rezistentne na kolorokin. Štakori tretirani nanokapsulama kinina i kurkumina imali su 30% veći postotak preživljavanja nego oni tretirani slobodnim kininom. Nanokapsule su pokazale najveću redukciju parazitacije (~80%) s većom učinkovitošću od ekvimolarne smjese kinina i kurkumina u omjeru 2:1. Ovako pripremljene nanokapsule povećale su antiparazitski učinak, pogotovo na sojeve *P. falciparum* rezistentne na kolorokin.

#### **4.5.3. OSTALE NANOFORMULACIJE**

Još jedan novi oralni samoemulgirajući lipidni sustav dostave lijekova formuliran je uklapanjem praha kurkumina (slobodan kurkumin) ili u kombinaciji s antimalarikom artemotilom te mu je ispitan *in vivo* antiparazitski učinak na *P. berghei*. U želučanom mediju lipidni sustavi s velikim kapacitetom uklapanja kurkumina spontano samoemulgiraju

formirajući nanočestice veličine 30-40 nm. Lipidni sustavi s uklopljenim kurkuminom pokazali su skromnu antimalarijsku aktivnost kod miševa pri koncentraciji 100 mg/kg. S druge strane, kombinacijom kurkuminskih lipidnih sustava sa subterapijskim dozama artemotila u lipidnom sustavu (12 mg/kg) postignut je porast stope preživljavanja miševa sa značajnom odgodom ponovnog izbijanja bolesti. Kombinacijom većih koncentracija artemotila (18-24 mg/kg) i kurkumina (150-200 mg/kg) moguće je potpuno izlječenje i dugotrajna zaštita od malarije. Istraživanje je pokazalo da kombiniranje oralnih lipidnih formulacija kurkumina i artemotila predstavlja obećavajući pristup u borbi protiv bolesti (Memvanga i sur., 2013). U drugome istraživanju, esterifikacijom jedne ili dvije fenolne skupine kurkumina s 1,1',2-trinorskvalenskom kiselinom formulirani su skvalenoil-kurkumini, stabilni nano-sklopovi homogene veličine. Za razliku od kurkumina, nastale nanoformulacije bile su inaktivne na vrstu *T. brucei*, dok su na vrstu *Leishmania donovani* nano-sklopovi imali pojačani učinak. Zbog jednostavne metode pripreme te topljivosti u vodi ili puferima bez korištenja organskih otapala ove nanoformulacije su potencijalni kandidati u terapiji visceralne lišmanioze (Cheikh-Ali i sur., 2014).

## 5. ZAKLJUČAK

Uklapanjem polifenola kurkumina s brojnim pleiotrofnim učincima u različite nanoformulacije poput liposoma, nanoemulzija, hidrogelova, micela, nanokristala moguće je premostiti njegove loše karakteristike koje posljedično dovode do slabe biomedicinske primjene ove ljekovite tvari. Rezultati brojnih *in vitro*, *ex vivo* i *in vivo* ispitivanja prikazanih u ovom radu pokazuju da se uklapanjem kurkumina u nanoformulacije postiže: veća topljivost s kontroliranim i/ili produženim oslobađanjem, povećana bioraspoloživost i stabilnost, te jači antimikrobni učinak uz smanjenje toksičnosti i iritacija. Time kurkumin postaje potencijalni kandidat u terapiji različitih infektivnih bolesti današnjice zahvaljujući manjim potrebnim dozama i rjeđoj učestalosti doziranja. Međutim, radi se o novijem pristupu liječenja pa su potrebne dodatne studije i klinička ispitivanja kako bi se potvrdila njegova terapijska vrijednost.

## 6. POPIS OZNAKA I KRATICA KORIŠTENIH U DIPLOMSKOM RADU

AC-CL	konvencionalni liposomi artemisininina i kurkumina
A-CL	konvencionalni liposomi artemisininina
AC-PL	PEG-ilirani liposomi artemisininina i kurkumina
Ag <sup>+</sup>	ioni (kationi) srebra
A-PL	PEG-ilirani liposomi artemisininina
ATP	adenozin trifosfat
AUC	opseg apsorpcije (površina ispod krivulje)
BCS	Biofarmaceutska klasifikacija lijekova
CFU	jedinice koje tvore kolonije
CHIKV	<i>Chikungunya virus</i>
C <sub>max</sub>	maksimalna koncentracija
DMPC	dimiristoil-fosfatidilkolin
DMPG	dimiristoil-fosfatidilglicerol
DMSO	dimetil sulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
FΔF	fenilalanin- $\alpha,\beta$ - dehidrofenilalanin
FDA	Američka agencija za hranu i lijekove
FTsZ	filamentni mutant Z-osjetljiv na temperaturu
GI <sub>50</sub>	koncentracija koja inhibira proliferaciju (rast) 50% stanica
GRAS	generalno priznat kao siguran
HAP	hidroksiapatit
HCV	virus hepatitisa C
Hep-2	humane epitelne larinks (tumorske) stanice
HIV	virus humane imunodeficijencije
HPV	humani papiloma virus
HSV-1	<i>herpes simplex virus tip 1</i>
HSV-2	<i>herpes simplex virus tip 2</i>
Huh7,5	stanična linija hepatocelularnog karcinoma
IC <sub>50</sub>	koncentracija koja uzrokuje 50%-tnu inhibiciju
IL-1 $\beta$	interleukin 1 beta
IL-6	interleukin 6



IUPAC	Međunarodna unija za čistu i primijenjenu kemiju
M.I.T.	Tehnološki institut države Massachusetts
MBK	minimalna baktericidna koncentracija
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
MRSA	meticilin rezistentan <i>Staphylococcus aureus</i>
NLC	nanostrukturirani lipidni nosači
NS5B	nestrukturni protein 5B
P60	Polifenon 60
PCR	lančana reakcija polimeraze
PEG	polietilenglikol
PLA	polimljična kiselina
PLGA	kopolimer mliječne i glikolne kiseline
ppm	dijelova na milijun
PVSA	natrijeva sol polivinilsulfonske kiseline
ROS	reaktivni kisikovi radikali
RSV	respiratorni sincicijski virus
SLN	čvrste lipidne nanočestice
$t_{1/2}$	vrijeme polueliminacije
TA	2,4,6-trialiloksi 1,3,5-triazin
$T_{max}$	vrijeme potrebno za postizanje maksimalne koncentracije
TNF- $\alpha$	faktor nekroze tumora-alfa
TPP	tripolifosfat
ZIKV	<i>Zika virus</i>

## 7. LITERATURA

Aboueldahab M, Elhussieny E. Antiparasitic and physiological evaluation of *Curcuma longa* extract and/or PZQ on *Schistosoma mansoni* infected mice. *International Journal of Advanced Research*, 2016, 4, 1020-1039.

Akbar M, Zia K, Nazir A, Iqbal J, Ejaz S, Akash M. Pluronic-based mixed polymeric micelles enhance the therapeutic potential of curcumin. *American Association of Pharmaceutical Scientists PharmSciTech*, 2018, 19, 2719-2739.

Akhtar F, Rizvi M, Kar S. Oral delivery of curcumin bound to chitosan nanoparticles cured *Plasmodium yoelii* infected mice. *Biotechnology Advances*, 2012, 30, 310-320.

Alam S, Panda J, Mukherjee T, Chauhan V. Short peptide based nanotubes capable of effective curcumin delivery for treating drug resistant malaria. *Journal of Nanobiotechnology*, 2016, 14, 26.

Alihosseini F, Azarmi S, Ghaffari S, Haghghat S, Rezayat Sorkhabadi S. Synergic antibacterial effect of curcumin with ampicillin; free drug solutions in comparison with SLN dispersions. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 2016, 6, 461-465.

Alippilakkotte S, Sreejith L. Pectin mediated synthesis of curcumin loaded poly(lactic acid) nanocapsules for cancer treatment. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2018, 48, 66-74.

Almagea Curcumin forte+, <https://ljekarna-kovacicek.hr>, pristupljeno 06.02.2021.

Anand P, Kunnumakkara A, Newman R, Aggarwal B. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Molecular Pharmaceutics*, 2007, 4, 807-818.

Anggakusuma, Colpitts C, Schang L, Rachmawati H, Frentzen A, Pfaender S, Behrendt P, Brown R, Bankwitz D, Steinmann J, Ott M, Meuleman P, Rice C, Ploss A, Pietschmann T, Steinmann E. Turmeric curcumin inhibits entry of all *hepatitis C virus* genotypes into human liver cells. *Gut*, 2013, 63, 1137-1149.

Arunraj T, Rejinold N, Mangalathillam S, Saroj S, Biswas R, Jayakumar R. Synthesis, characterization and biological activities of curcumin nanospheres. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 2014, 10, 238-250.

Asabuwa Ngwabebhoh F, Ilkar Erdagi S, Yildiz U. Pickering emulsions stabilized nanocellulosic-based nanoparticles for coumarin and curcumin nanoencapsulations: *in vitro* release, anticancer and antimicrobial activities. *Carbohydrate Polymers*, 2018, 201, 317-328.

Bader, Alnashi A, Fattah A. Antimicrobial activity of raw and nano turmeric powder extracts. *Middle East Journal of Applied Sciences*, 2016, 6, 787-796.

Bakand S, Hayes A. Toxicological considerations, toxicity assessment, and risk management of inhaled nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17, 929.

Bhawana, Basniwal R, Buttar H, Jain V, Jain N. Curcumin nanoparticles: preparation, characterization, and antimicrobial study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59, 2056-2061.

Bilušić, A. Što je nanotehnologija? *Matematičko fizički list*, 2006, 2, 145-146.

Cheikh-Ali Z, Caron J, Cojean S, Bories C, Couvreur P, Loiseau P, Desmaële D, Poupon E, Champy P. “Squalenoylcurcumin” nanoassemblies as water-dispersible drug candidates with antileishmanial activity. *ChemMedChem*, 2014, 10, 411-418.

Chen C, Johnston T, Jeon H, Gedaly R, McHugh P, Burke T, Ranjan D. An *in vitro* study of liposomal curcumin: stability, toxicity and biological activity in human lymphocytes and *Epstein-Barr virus*-transformed human B-cells. *International Journal of Pharmaceutics*, 2009, 366, 133-139.

Dai C, Wang Y, Sharma G, Shen J, Velkov T, Xiao X. Polymyxins–curcumin combination antimicrobial therapy: safety implications and efficacy for infection treatment. *Antioxidants*, 2020, 9, 506.

De Jong W., Borm P. Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *International Journal of Nanomedicine*, 2008, 3, 133-149.

Deka C, Aidew L, Devi N, Buragohain A, Kakati D. Synthesis of curcumin-loaded chitosan phosphate nanoparticle and study of its cytotoxicity and antimicrobial activity. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2016, 27, 1659-1673.

Devi K, Dhayanithi N, Kumar T, Balasundaram C, Harikrishnan R. *In vitro* and *in vivo* efficacy of partially purified herbal extracts against bacterial fish pathogens. *Aquaculture*, 2016, 458, 121-133.

Dhar M. L, Dhar M. M, Dhawan B. N, Mehrotra B. N, Ray C. Screening of Indian plants for biological activity: I. *Indian Journal of Experimental Biology*, 1968, 6, 232–247.

El Khoury E, Abiad M, Kassaify Z, Patra D. Green synthesis of curcumin conjugated nanosilver for the applications in nucleic acid sensing and anti-bacterial activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2015, 127, 274-280.

Flora G, Gupta D, Tiwari A. Nanocurcumin: a promising therapeutic advancement over native curcumin. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 2013, 30, 331-368.

Gandapu U, Chaitanya R, Kishore G, Reddy R, Kondapi A. Curcumin-loaded apotransferrin nanoparticles provide efficient cellular uptake and effectively inhibit HIV-1 replication *in vitro*. *PLOS ONE*, 2011, 6, e23388.

Gera M, Sharma N, Ghosh M, Huynh D, Lee S, Min T, Kwon T, Jeong D. Nanoformulations of curcumin: an emerging paradigm for improved remedial application. *Oncotarget*, 2017, 8, 66680-66698.

Ghaffari S, Alihosseini F, Rezayat Sorkhabadi S, Arbabi Bidgoli S, Mousavi S, Haghghat S, Afshar Nasab A, Kianvash N. Nanotechnology in wound healing; semisolid dosage forms containing curcumin-ampicillin solid lipid nanoparticles, *in-vitro*, *ex-vivo* and *in-vivo* characteristics. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 2018, 8, 395-400.

Ghalandarlaki N, Alizadeh A, Ashkani-Esfahani S. Nanotechnology-applied curcumin for different diseases therapy. *BioMed Research International*, 2014, 2014, 1-23.

Gómez-Estaca J, Balaguer M, López-Carballo G, Gavara R, Hernández-Muñoz P. Improving antioxidant and antimicrobial properties of curcumin by means of encapsulation in gelatin through electrohydrodynamic atomization. *Food Hydrocolloids*, 2017, 70, 313-320.

Gopal J, Muthu M, Chun S. Bactericidal property of macro-, micro- and nanocurcumin: an assessment. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 2015, 41, 2087-2093.

Gotmare V, Kole S, Athawale R. Sustainable approach for development of antimicrobial textile material using nanoemulsion for wound care applications. *Fashion and Textiles*, 2018, 5, 1-13.

Hatcher H, Planalp R, Cho J, Torti F, Torti S. Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2008, 65, 1631-1652.

Hazzah H, Farid R, Nasra M, Hazzah W, El-Massik M, Abdallah O. Gelucire-based nanoparticles for curcumin targeting to oral mucosa: preparation, characterization, and antimicrobial activity assessment. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2015, 104, 3913-3924.

Huang J, Li X, Zhou W. Safety assessment of nanocomposite for food packaging application. *Trends in Food Science & Technology*, 2015, 45, 187-199.

Hug Your Life Kurkuma 95% ekstrakt i Bioperin kapsule, <https://mojaljekarna.hr>, pristupljeno 04. 02. 2021.

Ipar V, Dsouza A, Devarajan P. Enhancing curcumin oral bioavailability through nanoformulations. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 2019, 44, 459-480.

Isacchi B, Bergonzi M, Grazioso M, Righeschi C, Pietretti A, Severini C, Bilia A. Artemisinin and artemisinin plus curcumin liposomal formulations: enhanced antimalarial efficacy against *Plasmodium berghei*-infected mice. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2012, 80, 528-534.

Jogiya B, Chudasama K, Thaker V, Joshi M. Synthesis and characterization of novel bio-material: nano composites of hydroxyapatite and curcumin. *International Journal of Applied Ceramic Technology*, 2017, 15, 148-160.

Jourghanian P, Ghaffari S, Ardjmand M, Haghghat S, Mohammadnejad M. Sustained release curcumin loaded solid lipid nanoparticles. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 2016, 6, 17-21.

Karthikeyan A, Senthil N, Min T. Nanocurcumin: a promising candidate for therapeutic applications. *Frontiers in Pharmacology*, 2020, 11, 487.

Kaur A, Saxena Y, Bansal R, Gupta S, Tyagi A, Sharma R, Ali J, Panda A, Gabrani R, Dang S. Intravaginal delivery of polyphenon 60 and curcumin nanoemulsion gel. *American Association of Pharmaceutical Scientists PharmSciTech*, 2017, 18, 2188-2202.

Kaur S, Modi N, Panda D, Roy N. Probing the binding site of curcumin in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* FtsZ – a structural insight to unveil antibacterial activity of curcumin. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2010, 45, 4209-4214.

Khamrai M, Banerjee S, Kundu P. Modified bacterial cellulose based self-healable polyelectrolyte film for wound dressing application. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 174, 580-590.

Khan M, Shameli K, Sazili A, Selamat J, Kumari S. Rapid green synthesis and characterization of silver nanoparticles arbitrated by curcumin in an alkaline medium. *Molecules*, 2019, 24, 719.

Khan N, Shreaz S, Bhatia R, Ahmad S, Muralidhar S, Manzoor N, Khan L. Anticandidal activity of curcumin and methyl cinnamaldehyde. *Fitoterapia*, 2012, 83, 434-440.

Kianvash N, Bahador A, Pourhajibagher M, Ghafari H, Nikoui V, Rezayat S, Dehpour, Partoazar A. Evaluation of propylene glycol nanoliposomes containing curcumin on burn wound model in rat: biocompatibility, wound healing, and anti-bacterial effects. *Drug Delivery and Translational Research*, 2017, 7, 654-663.

Kole S, Gotmare V, Athawale R. Novel approach for development of eco-friendly antimicrobial textile material for health care application. *The Journal of The Textile Institute*, 2018, 110, 254-266.

Krausz A, Adler B, Cabral V, Navati M, Doerner J, Charafeddine R, Chandra D, Liang H, Gunther L, Clendaniel A, Harper S, Friedman J, Nosanchuk J, Friedman A. Curcumin-encapsulated nanoparticles as innovative antimicrobial and wound healing agent. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2015, 11, 195-206.

Kurkumin kapsule, <https://ljekarne-lipa.hr>, pristupljeno 07.02.2021.

Lakshmi Y, Kumar P, Kishore G, Bhaskar C, Kondapi A. Triple combination MPT vaginal microbicide using curcumin and efavirenz loaded lactoferrin nanoparticles. *Scientific Reports*, 2016, 6, 25479.

Liu C, Huang H. Antimicrobial activity of curcumin-loaded myristic acid microemulsions against *Staphylococcus epidermidis*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2012, 60, 1118-1124.

Loo C, Rohanizadeh R, Young P, Traini D, Cavaliere R, Whitchurch C, Lee W. Combination of silver nanoparticles and curcumin nanoparticles for enhanced anti-biofilm activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 64, 2513-2522.

Loutfy S, Elberry M, Farroh K, Mohamed H, Mohamed A, Mohamed E, Faraag A, Mousa S. Antiviral activity of chitosan nanoparticles encapsulating curcumin against *hepatitis C virus* genotype 4a in human hepatoma cell lines. *International Journal of Nanomedicine*, 2021, 16, 1927-1928.

Madan S, Nehate C, Barman T, Rathore A, Koul V. Design, preparation, and evaluation of liposomal gel formulations for treatment of acne: *in vitro* and *in vivo* studies. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2018, 45, 395-404.

Maleki Dizaj S, Sharifi S, Ahmadian E, Eftekhari A, Adibkia K, Lotfipour F. An update on calcium carbonate nanoparticles as cancer drug/gene delivery system. *Expert Opin Drug Delivery*, 2019, 16, 331-345.

Martins C, da Silva D, Neres A, Magalhaes T, Watanabe G, Modolo L, Sabino A, de Fatima A, de Resende M. Curcumin as a promising antifungal of clinical interest. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2008, 63, 337-339.

Mathew D, Hsu W. Antiviral potential of curcumin. *Journal of Functional Foods*, 2018, 40, 692-699.

Memvanga P, Coco R, Pr at V. An oral malaria therapy: curcumin-loaded lipid-based drug delivery systems combined with  $\beta$ -arteether. *Journal of Controlled Release*, 2013, 172, 904-913.

Mittal A, Kumar N, Chauhan N. Curcumin encapsulated PEGylated nanoliposomes: a potential anti-infective therapeutic agent. *Indian Journal of Microbiology*, 2019, 59, 336-343.

Mohanty C, Sahoo S. The *in vitro* stability and *in vivo* pharmacokinetics of curcumin prepared as an aqueous nanoparticulate formulation. *Biomaterials*, 2010, 31, 6597-6611.

Moritz S, Wiegand C, Wesarg F, Hessler N, M ller F, Kralisch D, Hipler U, Fischer D. Active wound dressings based on bacterial nanocellulose as drug delivery system for octenidine. *International Journal of Pharmaceutics*, 2014, 471, 45-55.

Nanotehnika, <https://enciklopedija.hr>, pristupljeno 15.03.2021.

Naseri S, Darroudi M, Aryan E, Gholoobi A, Rahimi H, Ketabi K, Movaqar A, Abdoli M, Gouklani H, Teimourpour R, Meshkat Z. The antiviral effects of curcumin nanomicelles on the attachment and entry of *hepatitis C virus*. *Iranian Journal of Virology*, 2017, 11, 29–35.

Nayak A, Tiyafoonchai W, Patankar S, Madhusudhan B, Souto E. Curcuminoids-loaded lipid nanoparticles: novel approach towards malaria treatment. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2010, 81, 263-273.

Neelofar K, Shreaz S, Rimple B, Muralidhar S, Nikhat M, Khan L. Curcumin as a promising anticandidal of clinical interest. *Canadian Journal of Microbiology*, 2011, 57, 204-210.

Oyeyemi O, Morenkeji O, Afolayan F, Dauda K, Busari Z, Meena J, Panda A. Curcumin-artesunate based polymeric nanoparticle; antiplasmodial and toxicological evaluation in murine model. *Frontiers in Pharmacology*, 2018, 9, 562.

Pandit R, Gaikwad S, Agarkar G, Gade A, Rai M. Curcumin nanoparticles: physico-chemical fabrication and its *in vitro* efficacy against human pathogens. *3 Biotech*, 2015, 5, 991-997.

Paul S, Mohanram K, Kannan I. Antifungal activity of curcumin-silver nanoparticles against fluconazole-resistant clinical isolates of *Candida* species. *An International Quarterly Journal of Research in Ayurveda*, 2018, 39, 182-186.

Perkins S, Verschoyle RD, Hill K, Parveen I, Threadgill MD, Sharma RA, Williams ML, Steward WP, Gescher AJ. Chemopreventive efficacy and pharmacokinetics of curcumin in the min/+ mouse, a model of familial adenomatous polyposis. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 2002, 11, 535-540.

Praditya D, Kirchhoff L, Brüning J, Rachmawati H, Steinmann J, Steinmann E. Anti-infective properties of the golden spice curcumin. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10, 912.

Preis E, Baghdan E, Agel M, Anders T, Poursaghar M, Schneider M, Bakowsky U. Spray dried curcumin loaded nanoparticles for antimicrobial photodynamic therapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2019, 142, 531-539.

Rahbar Takrami S, Ranji N, Sadeghizadeh M. Antibacterial effects of curcumin encapsulated in nanoparticles on clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* through downregulation of efflux pumps. *Molecular Biology Reports*, 2019, 46, 2395-2404.

Rai M, Ingle A, Pandit R, Paralikar P, Anasane N, Santos C. Curcumin and curcumin-loaded nanoparticles: antipathogenic and antiparasitic activities. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 2020, 18, 367-379.

Rai M, Pandit R, Gaikwad S, Yadav A, Gade A. Potential applications of curcumin and curcumin nanoparticles: from traditional therapeutics to modern nanomedicine. *Nanotechnology Reviews*, 2015, 4, 161-172.

Said D, Elsamad L, Gohar Y. Validity of silver, chitosan, and curcumin nanoparticles as anti-*Giardia* agents. *Parasitology Research*, 2012, 111, 545-554.

Sattari S, Dadkhah Tehrani A, Adeli M. pH-responsive hybrid hydrogels as antibacterial and drug delivery systems. *Polymers*, 2018, 10, 660.

Sharma M, Manoharlal R, Puri N, Prasad R. Antifungal curcumin induces reactive oxygen species and triggers an early apoptosis but prevents hyphae development by targeting the global repressor TUP1 in *Candida albicans*. *Bioscience Reports*, 2010, 30, 391-404.

Shishodia S. Curcumin: getting back to the roots. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2005, 1056, 206-217.

Silva A, Santos P, Silva J, Leimann F, Bracht L, Gonçalves O. Impact of curcumin nanoformulation on its antimicrobial activity. *Trends in Food Science & Technology*, 2018, 72, 74-82.

Siviero A, Gallo E, Maggini V, Gori L, Mugelli A, Firenzuoli F, Vannacci A. Curcumin, a golden spice with a low bioavailability. *Journal of Herbal Medicine*, 2015, 5, 57-70.

Solgar Omnium tablete, <https://mojaljekarna.hr>, pristupljeno 20.02.2021.

Song Z, Wu Y, Wang H, Han H. Synergistic antibacterial effects of curcumin modified silver nanoparticles through ROS-mediated pathways. *Materials Science and Engineering: C*, 2019, 99, 255-263.



Subramani P, Panati K, Lebaka V, Reddy D, Narala V. Nanostructures for curcumin delivery: possibilities and challenges. U: Nano- and microscale drug delivery systems: design and fabrication. Grumezescu A, urednici, Amsterdam, *Elsevier*, 2017, str. 393-418.

Škalko-Basnet N, Vanić Ž. Lipid-based nanopharmaceuticals in antimicrobial therapy. U: Functionalized nanomaterials for the management of microbial infection. Boukherroub R, Szunerits S, Drider D, urednici, Amsterdam, *Elsevier*, 2017, str. 111–152.

Teow S, Liew K, Ali S, Khoo A, Peh S. Antibacterial action of curcumin against *Staphylococcus aureus*: a brief review. *Journal of Tropical Medicine*, 2016, 2016, 1-10.

Tong W, bin Abdullah A, binti Rozman N, bin Wahid M, Hossain M, Ring L, Lazim Y, Tan W. Antimicrobial wound dressing film utilizing cellulose nanocrystal as drug delivery system for curcumin. *Cellulose*, 2017, 25, 631-638.

Trigo Gutierrez J, Zanatta G, Ortega A, Balastegui M, Sanitá P, Pavarina A, Barbugli P, Mima E. Encapsulation of curcumin in polymeric nanoparticles for antimicrobial photodynamic therapy. *PLOS ONE*, 2017, 12, e0187418.

Trujillo J, Chirino Y, Molina-Jijón E, Andérica-Romero A, Tapia E, Pedraza-Chaverrí J. Renoprotective effect of the antioxidant curcumin: recent findings. *Redox Biology*, 2013, 1, 448-456.

Tuan D, Na P, Hang D, Du C, Anh M, Vu D, Ha T, Trung N, Quyen T. Nanocurcumin and chitosan-pluronic f127-based hydrogel for 3rd degree burn treatment. *Vietnam Journal of Science and Technology*, 2018, 56, 594-603.

Tyagi P, Singh M, Kumari H, Kumari A, Mukhopadhyay K. Bactericidal activity of curcumin I is associated with damaging of bacterial membrane. *PLOS ONE*, 2015, 10, e0121313.

Varaprasad K, Mohan Y, Vimala K, Mohana Raju K. Synthesis and characterization of hydrogel-silver nanoparticle-curcumin composites for wound dressing and antibacterial application. *Journal of Applied Polymer Science*, 2011, 121, 784-796.

Varaprasad K, Yallapu M, Núñez D, Oyarzún P, López M, Jayaramudu T, Karthikeya C. Generation of engineered core–shell antibiotic nanoparticles. *Royal Society of Chemistry Advances*, 2019, 9, 8326-8332.

Varshosaz J, Ghaffari S, Khoshayand M, Atyabi F, Dehkordi A, Kobarfard F. Optimization of freeze-drying condition of amikacin solid lipid nanoparticles using D-optimal experimental design. *Pharmaceutical Development and Technology*, 2010, 17, 187-194.

Velasques K, Maciel T, de Castro Dal Forno A, Teixeira F, da Fonseca A, Varotti F, Fajardo A, Ávila D, Haas S. Co-nanoencapsulation of antimalarial drugs increases their *in vitro* efficacy against *Plasmodium falciparum* and decreases their toxicity to *Caenorhabditis elegans*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2018, 118, 1-12.

Xie M, Fan D, Zhao Z, Li Z, Li G, Chen Y, He X, Chen A, Li J, Lin X, Zhi M, Li Y, Lan P. Nano-curcumin prepared via supercritical: improved anti-bacterial, anti-oxidant and anti-cancer efficacy. *International Journal of Pharmaceutics*, 2015, 496, 732-740.

Xue B, Zhang Y, Xu M, Wang C, Huang J, Zhang H, Meng S, Xie M, Tao A, Li X. Curcumin-silk fibroin nanoparticles for enhanced anti-*Candida albicans* activity *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 2019, 15, 769-778.

Yallapu M, Nagesh P, Jaggi M, Chauhan S. Therapeutic applications of curcumin nanoformulations. *The American Association of Pharmaceutical Scientists Journal*, 2015, 17, 1341-1356.

Yang X, Li C, Huang C. Curcumin modified silver nanoparticles for highly efficient inhibition of *respiratory syncytial virus* infection. *Nanoscale*, 2016, 8, 3040-3048.

Yang X, Li C, Li Y, Wang J, Huang C. Synergistic antiviral effect of curcumin functionalized graphene oxide against *respiratory syncytial virus* infection. *Nanoscale*, 2017, 9, 16086-16092.

Yilmaz A, Bozkurt F, Cicek P, Dertli E, Durak M, Yilmaz M. A novel antifungal surface-coating application to limit postharvest decay on coated apples: molecular, thermal and morphological properties of electrospun zein–nanofiber mats loaded with curcumin. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2016, 37, 74-83.

Zhao Y, Lu C, Zhang Y, Xiao J, Zhao Y, Tian J, Xu Y, Feng Z, Xu C. Selection of high efficient transdermal lipid vesicle for curcumin skin delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 2013, 454, 302-309.

Zheng B, McClements D. Formulation of more efficacious curcumin delivery systems using colloid science: enhanced solubility, stability, and bioavailability. *Molecules*, 2020, 25, 2791.

Zorofchian Moghadamtousi S, Abdul Kadir H, Hassandarvish P, Tajik H, Abubakar S, Zandi K. A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin. *BioMed Research International*, 2014, 2014, 1-12.

## 8. SAŽETAK

Kurkumin, polifenol izoliran iz biljke *Curcuma longa*, potencijalni je kandidat za terapiju različitih bolesti zahvaljujući svojem antimikrobnom, antikancerogenom i antioksidativnom učinku. Međutim, loša fizikalno-kemijska svojstva poput slabe topljivosti u vodi, lipofilnosti, kemijske nestabilnosti i loše bioraspoloživosti ograničavaju njegovu kliničku primjenu. Uklapanjem u nanoformulacije poput liposoma, nanočestica, micela, hidrogelova, nanokristala moguće je unaprijediti farmakokinetička i farmakodinamička svojstva kurkumina te time uvelike unaprijediti terapiju. Brojna istraživanja pokazala su da se uklapanjem kurkumina u nanoformulacije postiže bolja distribucija polifenola u organizmu, poboljšani terapijski učinak s ciljanom dostavom, ravnomjerno i kontrolirano oslobađanje na mjestu djelovanja, produljeno vrijeme eliminacije, povećanje bioraspoloživosti te smanjenje neželjenih učinaka i toksičnosti na zdravo tkivo. Provedena najvažnija *ex vivo*, *in vivo* i klinička istraživanja objedinjena ovim radom sistematizirano su opisana s obzirom na vrstu/tip nanoformulacija i svojstva materijala korištenih za njihovu pripravu.

## 9. SUMMARY

Curcumin, a polyphenol isolated from the plant *Curcuma longa*, is a potential candidate for the treatment of various diseases due to its antimicrobial, anticancer and antioxidant effects. However, physicochemical properties of curcumin, such as poor water solubility, lipophilicity, chemical instability, and poor bioavailability limit its clinical application. Incorporation of curcumin into various nanoformulations (lipid and polymeric), can significantly improve its pharmacokinetic and pharmacodynamic properties, and thus significantly enhance the efficacy of therapy. Numerous studies have shown that curcumin nanoformulations allow better distribution of the polyphenol in the body, increased bioavailability, and therapeutic efficacy by enabling targeted and localized delivery, prolonged and/or controlled release at the site of action, decreased elimination time as well as reduced side effects and toxicity to the healthy tissue. The most important *ex vivo*, *in vivo*, and clinical studies included in this paper are systematically described with regard to the type of nanoformulations and the properties of the materials used for their preparation.

## 10. PRILOZI

Privole izdavača za objavljivanje slika i tablica u diplomskom radu nalaze se na sljedećim poveznicama:

<https://s100.copyright.com/CustomerAdmin/PLF.jsp?ref=5a532add-dd64-4e51-9309-db116135ffc1>

<https://s100.copyright.com/CustomerAdmin/PLF.jsp?ref=10fabcc9-b08b-48b6-a781-712996233737>

<https://s100.copyright.com/CustomerAdmin/PLF.jsp?ref=0768c2a0-a969-477f-be0a-11ea891fc296>

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za farmaceutsku tehnologiju  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### NANOFORMULACIJE KURKUMINA S ANTIMIKROBNIM DJELOVANJEM

Lucija Osmak

#### SAŽETAK

Kurkumin, polifenol izoliran iz biljke *Curcuma longa*, potencijalni je kandidat za terapiju različitih bolesti zahvaljujući svojem antimikrobnom, antikancerogenom i antioksidativnom učinku. Međutim, loša fizikalno-kemijska svojstva poput slabe topljivosti u vodi, lipofilnosti, kemijske nestabilnosti i loše bioraspoloživosti ograničavaju njegovu kliničku primjenu. Uklapanjem u nanoformulacije poput liposoma, nanočestica, micela, hidrogelova, nanokristala moguće je unaprijediti farmakokinetička i farmakodinamička svojstva kurkumina te time uvelike unaprijediti terapiju. Brojna istraživanja pokazala su da se uklapanjem kurkumina u nanoformulacije postiže bolja distribucija polifenola u organizmu, poboljšani terapijski učinak s ciljanom dostavom, ravnomjerno i kontrolirano oslobađanje na mjestu djelovanja, produljeno vrijeme eliminacije, povećanje bioraspoloživosti te smanjenje neželjenih učinaka i toksičnosti na zdravo tkivo. Provedena najvažnija *ex vivo*, *in vivo* i klinička istraživanja objedinjena ovim radom sistematizirano su opisana s obzirom na vrstu/tip nanoformulacija i svojstva materijala korištenih za njihovu pripravu.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 59 stranica, 3 grafička prikaza, 4 tablice i 103 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: kurkumin, antimikrobno djelovanje, nanoformulacije, bioraspoloživost, topljivost

Mentor: **Dr. sc. Željka Vanić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Željka Vanić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Mario Jug**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Sanda Vladimir-Knežević**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: srpanj 2021.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Pharmaceutical Technology  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### CURCUMIN NANOFORMULATIONS WITH ANTIMICROBIAL ACTIVITY

**Lucija Osmak**

#### SUMMARY

Curcumin, a polyphenol isolated from the plant *Curcuma longa*, is a potential candidate for the treatment of various diseases due to its antimicrobial, anticancer and antioxidant effects. However, physicochemical properties of curcumin, such as poor water solubility, lipophilicity, chemical instability, and poor bioavailability limit its clinical application. Incorporation of curcumin into various nanoformulations (lipid and polymeric), can significantly improve its pharmacokinetic and pharmacodynamic properties, and thus significantly enhance the efficacy of therapy. Numerous studies have shown that curcumin nanoformulations allow better distribution of the polyphenol in the body, increased bioavailability, and therapeutic efficacy by enabling targeted and localized delivery, prolonged and/or controlled release at the site of action, decreased elimination time as well as reduced side effects and toxicity to the healthy tissue. The most important *ex vivo*, *in vivo*, and clinical studies included in this paper are systematically described with regard to the type of nanoformulations and the properties of the materials used for their preparation.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 59 pages, 3 figures, 4 tables and 103 references. Original is in Croatian language.

Keywords: curcumin, antimicrobial activity, nanoformulations, bioavailability, solubility

Mentor: **Željka Vanić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Željka Vanić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Mario Jug, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Sanda Vladimir-Knežević, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2021.